



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, PEDIATRÍA Y RADIOLOGÍA

**“DETERMINACIÓN DE VALORES NORMALES DE SUSTANCIA  
P EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE NEONATOS”**

**TESIS DOCTORAL**

**María Esther García Rodríguez**

Sevilla, 2015



**DÑA. MARÍA ESTHER GARCÍA RODRÍGUEZ, LICENCIADA EN MEDICINA  
Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

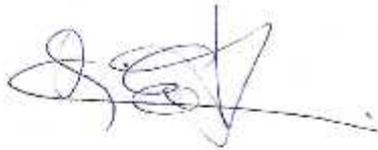
***CERTIFICA:***

Que es la autora del trabajo titulado "Valores normales de sustancia P en líquido cefalorraquídeo de neonatos"

Este trabajo ha sido dirigido por Dña. María Luisa Rosso González y Don Miguel Muñoz Sáez, doctores en Medicina y Cirugía, y tutorizado por Dña. Catalina Mércuez Vega, profesora asociada del departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, se expide el presente certificado

En Sevilla, 7 de octubre de 2015



Fdo: María Esther García Rodríguez



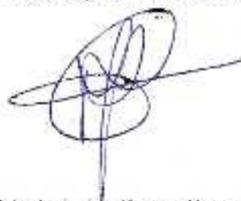
DRA DOÑA MARÍA LUISA ROSSO GONZÁLEZ, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA  
POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que bajo su dirección la Licenciada en Medicina y Cirugía Doña María Esther García Rodríguez ha realizado el trabajo titulado "DETERMINACIÓN DE VALORES NORMALES DE SUSTANCIA P EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE NEONATOS".

El trabajo reúne en su criterio todas las características exigibles desde el punto de vista legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 23 de Septiembre de 2013



Fdo. Dra. María Luisa Rosso González



DR. D. MIGUEL MUÑOZ SÁEZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que bajo su dirección la Licenciada en Medicina y Cirugía Doña María Esther García Rodríguez ha realizado el trabajo titulado "**DETERMINACIÓN DE VALORES NORMALES DE SUSTANCIA P EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE NEONATOS**".

El trabajo reúne en su criterio todas las características exigibles desde el punto de vista legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 23 de Septiembre de 2015



Fdo. Dr. D. Miguel Muñoz Sáez



DRA DOÑA CATALINA MÁRQUEZ VEGA, PROFESORA ASOCIADA DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, PEDIATRÍA Y RADIOLOGÍA, DE LA UNIVERSIDAD DE MEDICINA DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que bajo su tutorización la Licenciada en Medicina y Cirugía Doña María Esther García Rodríguez ha realizado el trabajo titulado "DETERMINACIÓN DE VALORES NORMALES DE SUSTANCIA P EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE NEONATOS".

El trabajo reúne en su criterio todas las características exigibles desde el punto de vista legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 23 de Septiembre de 2015



Fdo. Catalina Márquez Vega



*A mis padres*  
*A mi hija Esther*  
*...y a Rafa*



*“Sólo la verdad os hará libres”*

San Juan

*“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”*

Albert Einstein



## **AGRADECIMIENTOS:**

En primer lugar, mi más profundo agradecimiento a mis directores Marisa y Miguel, por su dedicación y generosidad. Amar la ciencia es más fácil a vuestro lado.

Al Dr. Antonio Pavón, director emérito. Gracias por tu cariño y paciencia, y por estar siempre ahí.

A mis compañeros, por vuestra culpa viajo en tren dos veces cada día.

A mis padres, sois para mí ejemplo de amor y entrega infinitos.

A mi hija Esther. Lo que más me enorgullece de este trabajo es el haber conseguido no quitarte ni un minuto de mi tiempo para llevarlo a cabo; cada palabra ha sido redactada mientras soñabas...

A mis hermanos.

A mi familia, a los que están y a los que se acaban de marchar.

A Rafa, sabes como nadie ponerme los pies en la tierra.



## ABREVIATURAS

BHE barrera hematoencefálica  
BPEG bajo peso para la edad gestacional  
CCK colecistoquinina  
CD células dendríticas  
CMH células madre hematopoyéticas  
DS desviaciones estándar  
EB exceso de bases  
EDTA ethylenediaminetetraacetic acid  
EHI encefalopatía hipóxico-isquémica  
EKA (B, C y D) endokinina A (B, C y D)  
ELISA enzimoimmunoanálisis  
EPN endopeptidasa neutra  
GABA ácido gamma-aminobutírico  
HIF1A factor hipoxia-inducible 1  
HPLC cromatografía líquida de alta eficacia  
ITU infección del tracto urinario  
IL interleuquina  
LCR líquido cefalorraquídeo  
MAPK “mitogen-activated protein kinase”  
MDR “multidrug resistant receptor”  
HK-1 hemokinina 1  
NKA (B) neurokinina A (B)  
NO óxido nítrico  
NP neuropéptido  
NPY neuropéptico tirosina  
NP neuropéptico gamma  
NPK neuropéptico K  
PAEG peso adecuado para la edad gestacional  
PCR proteína C reactiva  
PIC presión intracraneal  
PL punción lumbar  
PPT-I preprotaquikina 1  
PRGC péptido relacionado con el gen de la calcitonina  
RAPG receptor acoplado a una proteína G  
RIA radioinmunoanálisis  
RN recién nacido  
RNMBP recién nacido muy bajo peso  
RNT recién nacido a término  
RNPT recién nacido pretérmino  
RTK receptor taquicinérgico

SI sistema inmune

SNC sistema nervioso central

SP sustancia P

TAC (1, 2 y 4) gen preprotaquiquinina (1, 2 y 4)

TACR (1, 2 y 3) gen del receptor de taquiquinina (1, 2 y 3)

TK taquicinina

TNF factor de necrosis tumoral

VIP péptido intestinal vasoactivo

VRS virus respiratorio sincitial

# ÍNDICE

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **1. EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO**

1.1 Formación, flujo y absorción del LCR.....	2
1.2 Barreras hematocefalorraquídea y hematoencefálica.....	9
1.3 Estudio del LCR.....	19

## **2. LA SUSTANCIA P Y EL RECEPTOR NK1**

2.1 Neuronas, sinapsis y neurotransmisores.....	34
2.2 Neuropeptidos (NP).....	50
2.3 Taquicininas (TK).....	69
2.4 Receptores taquicinérgicos (RTK).....	79
2.5 Sustancia P (SP).....	85
2.6 Receptores NK1.....	90
2.6.1 Agonistas de los receptores NK1.....	95
2.6.2 Antagonistas de los receptores NK1.....	98
2.7 Efectos fisiológicos y fisiopatológicos del sistema SP/NK1 receptor.....	102

# **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

<b>1. HIPÓTESIS.....</b>	<b>119</b>
--------------------------	------------

<b>2. OBJETIVO</b> .....	121
--------------------------	-----

### **III. MATERIAL Y MÉTODO**

#### **1. MATERIAL**

1.1. Material fungible.....	123
-----------------------------	-----

1.2. Material inventariable.....	123
----------------------------------	-----

1.3. Material biológico: Recogida de muestras.....	124
--	-----

#### **2. MÉTODO**

2.1. Diseño del estudio.....	127
------------------------------	-----

2.2. Población del estudio. Número de muestras.....	127
---	-----

2.3. Aspectos éticos.....	127
---------------------------	-----

2.4. Enzimoimmunoanálisis (ELISA).....	128
--	-----

#### **3. RECOGIDA DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS**

<b>Y CLÍNICOS</b> .....	133
-------------------------	-----

<b>4. ANÁLISIS DE LOS DATOS</b> .....	134
---------------------------------------	-----

<b>IV. RESULTADOS</b> .....	135
-----------------------------	-----

<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	146
---------------------------	-----

<b>VI. RESUMEN</b> .....	185
--------------------------	-----

<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	188
--------------------------------	-----

<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	191
---------------------------------	-----

# **FIGURAS**

- Figura 1** Esquemática del flujo normal del LCR
- Figura 2** Plexo coroideo en un ventrículo lateral
- Figura 3** Drenaje de un espacio perivascular hacia el espacio subaracnoideo
- Figura 4** Estructura de la unidad neurovascular y de la unión intercelular estrecha
- Figura 5** Mecanismos de transporte de la BHE
- Figura 6** Comparación del recuento de leucocitos en LCR de RN con y sin meningitis
- Figura 7** Recuento de leucocitos en RN “normales” y “sintomáticos”
- Figura 8** Dibujos realizados por Cajal de diferentes estructuras del SNC
- Figura 9** Estructura de una neurona grande perteneciente al encéfalo
- Figura 10** Fotografía al microscopio óptico de una gran motoneurona
- Figura 11** Anatomía fisiológica de la sinapsis
- Figura 12** Sistema de segundo mensajero a través de proteína G
- Figura 13** Representación esquemática de la síntesis neuronal de NP
- Figura 14** Estructura de un receptor de la familia de los RAPG
- Figura 15** Receptor acoplado a proteína G (RAPG)
- Figura 16** Mecanismos efectores de la proteína G
- Figura 17** Representación esquemática de la estructura de los RTK
- Figura 18** Representación esquemática de la organización de los genes que codifican los RTK humanos
- Figura 19** Imagen tridimensional de la SP
- Figura 20** Mecanismo de acción de la SP
- Figura 21** Representación esquemática que muestra los sitios de unión del receptor NK1
- Figura 22** Representación tridimensional de la estructura de L-732,138, L-733,060 y aprepitant.
- Figura 23** Sitios de unión al receptor NK1 de SP y aprepitant
- Figura 24** Resumen de las acciones hematopoyéticas de la SP y NK-A
- Figura 25** Descripción del ELISA competitivo para SP
- Figura 26** Esquema de curva estándar de preparación de ELISA
- Figura 27** Edad

- Figura 28** EG
- Figura 29** Sexo
- Figura 30** Clínica inicial
- Figura 31** Valores de PCR
- Figura 32** Valores SP
- Figura 33** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra
- Figura 34** Histograma sobre la distribución de los valores de SP
- Figura 35** Nube de puntos sobre la correlación Edad/Valor SP
- Figura 36** Nube de puntos sobre la correlación EG/Valor SP
- Figura 37** Nube de puntos sobre la correlación PCR/Valor SP
- Figura 38** Diagnóstico final de los RN sometidos a PL
- Figura 39** Degradación de la SP en LCR
- Figura 40** Aumento de los niveles de HIF1A conforme aumentan los de SP

# **TABLAS**

- Tabla 1** Técnica de la PL en pediatría
- Tabla 2** Primeros estudios de recuento de leucocitos en LCR de RN
- Tabla 3** Parámetros obtenidos en LCR para RN de alto riesgo sin meningitis
- Tabla 4** Valores de leucocitos en LCR de RNMBP según el peso al nacimiento
- Tabla 5** Valores de leucocitos en LCR de RNMBP <1.000g según la edad cronológica
- Tabla 6** Valores de leucocitos en LCR de RNMBP 1.001-1.500g según edad cronológica
- Tabla 7** Valores de leucocitos en LCR de RNMBP según la edad postconcepcional
- Tabla 8** Edad, patógeno urinario y recuento de leucocitos en LCR en 15 lactantes con ITU y pleocitosis estéril en LCR concomitante
- Tabla 9** Clasificación de los NT según el tipo de molécula y mecanismo de acción
- Tabla 10** Clasificación de los principales NP de mamíferos
- Tabla 11** Secuencia de los diferentes NP que integran la familia de las TK de mamíferos
- Tabla 12** Genes de las TK humanas
- Tabla 13** Comparación de la afinidad de las TK por cada tipo de RTK
- Tabla 14** Genes de los RTK humanos
- Tabla 15** Estructura y nombre de los principales agonistas peptídicos del receptor NK1
- Tabla 16** Principales antagonistas peptídicos del receptor NK1
- Tabla 17** Montaje de la placa
- Tabla 18** Preparación de la placa. Adición de los reactivos y de las muestras a la placa
- Tabla 19** Clínica inicial
- Tabla 20** Valores de SP en LCR en adultos según diferentes estudios (RIA)
- Tabla 21** Niveles de SP en LCR en “humanos normales” en relación a la edad



# **INTRODUCCIÓN**

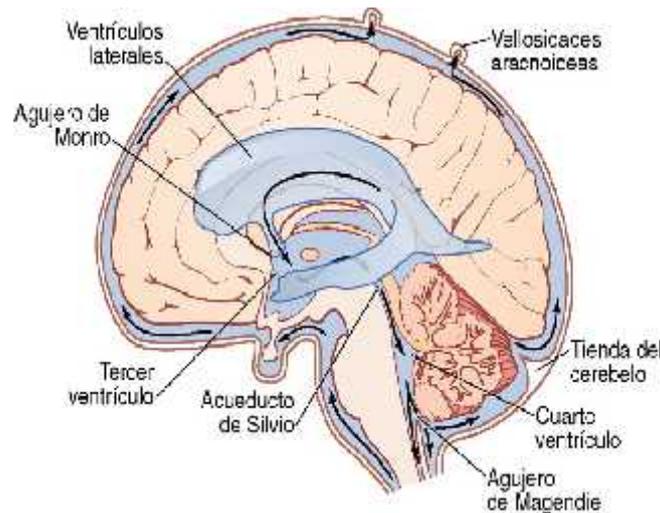
## **1. EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO:**

El líquido cefalorraquídeo (LCR), también llamado líquido cerebrospinal por su traducción literal del inglés, es un líquido transparente contenido en los ventrículos cerebrales, espacio subaracnoideo y conducto medular cuya función “clásica” es la de amortiguación, aunque también tiene un importante papel en cuanto al transporte de sustancias involucradas en la homeostasis y metabolismo del SNC, así como en situaciones patológicas del mismo. Presenta un flujo continuo a través de los mencionados espacios, siendo su producción constante, y el equilibrio en su reabsorción unido a la ausencia de obstrucción a su paso contribuyen al mantenimiento constante de la presión intracraneal.

### **1.1 Formación, flujo y absorción del LCR:**

El LCR se forma a una velocidad de unos 500 ml diarios en el adulto, lo que supone el triple o el cuádruple de su volumen total en todo el sistema. El volumen total de LCR oscila en adultos entre 90 y 150 ml (la mitad intracraneal y la otra mitad espinal), mientras que en el recién nacido (RN) estas cifras oscilan entre 10 y 60 ml (Rodríguez-Segade, 2006). Alrededor de dos tercios o más de esta cantidad se debe a la secreción desde los plexos coroideos en los cuatro ventrículos, sobre todo en los dos ventrículos laterales. Un poco más se produce en la superficie endimaria de todos los ventrículos y en la aracnoides. Un pequeño porcentaje procede del propio encéfalo a través de los espacios perivascuales que quedan alrededor de los vasos sanguíneos que atraviesan el encéfalo. Las flechas de la Figura 1 muestran que los principales canales para el líquido nacen en los plexos coroideos y después siguen el sistema del LCR. La parte segregada en los ventrículos laterales pasa primero hacia el tercer ventrículo; después, tras la incorporación de una mínima cantidad más en esta cavidad, desciende a

lo largo del acueducto de Silvio hacia el cuarto ventrículo, donde aún se añade otra minúscula proporción de líquido. Finalmente, sale del cuarto ventrículo por tres pequeños orificios, los dos agujeros laterales de Luschka y el agujero central de Magendie, para penetrar en la cisterna magna, un espacio de líquido que queda detrás del bulbo raquídeo y debajo del cerebelo.

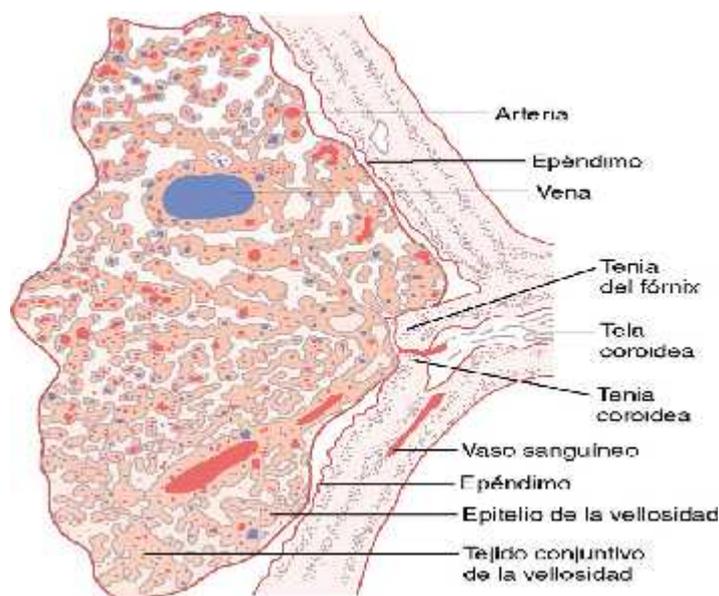


**Figura 1** Las flechas indican el camino seguido por el flujo del líquido cefalorraquídeo desde los plexos coroideos en los ventrículos laterales hasta las vellosidades aracnoideas que sobresalen hacia los senos de la duramadre (Guyton & Hall, 2011).

La cisterna magna se continúa con el espacio subaracnoideo que rodea al encéfalo y la médula espinal en su integridad. Casi todo el LCR asciende a continuación desde la cisterna magna a través de estos espacios subaracnoideos alrededor del cerebro. Desde aquí, penetra por las múltiples vellosidades aracnoideas que sobresalen hacia el gran seno venoso sagital y otros senos venosos cerebrales, y las atraviesa. Por tanto, todo el líquido sobrante se vierte hacia la sangre venosa a través de los poros de estas vellosidades.

## Secreción por el plexo coroideo.

El plexo coroideo, cuyo corte se observa en la Figura 2, está formado por una maraña de vasos sanguíneos recubierta por una delgada capa de células epiteliales. Este plexo se proyecta hacia el asta temporal de cada ventrículo lateral, la porción posterior del tercer ventrículo y el techo del cuarto ventrículo.



**Figura 2** Plexo coroideo en un ventrículo lateral (Guyton & Hall, 2011).

La secreción de líquido hacia los ventrículos por el plexo coroideo depende sobre todo del transporte activo de iones sodio a través de las células epiteliales que tapizan su parte externa. A su vez, los iones sodio arrastran también grandes cantidades de iones cloruro debido a que su carga positiva atrae la negativa de estos últimos. Los dos combinados elevan el contenido de cloruro sódico en el LCR, que está dotado de actividad osmótica, por lo que a continuación provoca la ósmosis casi inmediata de agua a través de la membrana, para aportar el líquido de la secreción. Otros procesos de transporte menos importantes desplazan pequeñas cantidades de glucosa hacia el LCR y extraen iones potasio y bicarbonato hacia los capilares desde su interior. Por tanto, las

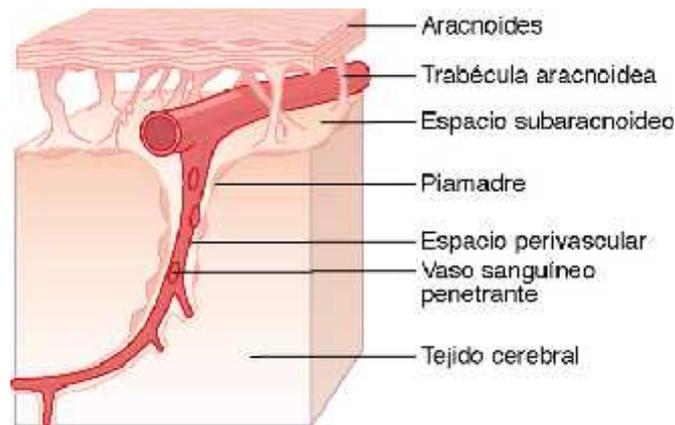
características finales del LCR pasan a ser las siguientes: presión osmótica, aproximadamente igual a la del plasma; concentración de iones sodio, similar a la del plasma; iones cloruro, en torno a un 15% mayor que en el plasma; iones potasio un 40% menos, y glucosa, aproximadamente un 30% menos.

### **Absorción del LCR a través de las vellosidades aracnoideas.**

Las vellosidades aracnoideas son proyecciones digitiformes microscópicas de la aracnoidea hacia dentro que atraviesan las paredes y van dirigidas hacia los senos venosos. Sus conglomerados forman estructuras macroscópicas llamadas granulaciones aracnoideas, que pueden verse sobresalir hacia los senos. Con el microscopio electrónico se ha observado que las células endoteliales que cubren las vellosidades presentan pasadizos vesiculares directos a través de su soma con unas dimensiones suficientes como para permitir el flujo relativamente libre hacia la sangre venosa de: LCR, moléculas proteicas disueltas, y hasta partículas del tamaño de los glóbulos rojos y blancos (Guyton & Hall, 2011).

### **Espacios perivasculares y LCR.**

Las grandes arterias y venas del encéfalo se hallan sobre su superficie, pero su tramo final penetra hacia el interior, y arrastra una capa de piamadre, la membrana que cubre al encéfalo, según se observa en la Figura 3. La piamadre está muy poco adherida a los vasos, por lo que existe un espacio, el espacio perivascular, entre ella y cada vaso. Así pues, los espacios perivasculares siguen a las arterias y las venas hacia el encéfalo hasta llegar a las arteriolas y las vénulas.



**Figura 3** Drenaje de un espacio perivascular hacia el espacio subaracnoideo (Ranson, 1959.)

### **Función linfática de los espacios perivasculares.**

Como sucede en cualquier otra parte del cuerpo, una pequeña cantidad de proteínas se filtra desde los capilares del encéfalo hacia sus espacios intersticiales. Dado que en el tejido cerebral no existen auténticos vasos linfáticos, este exceso proteico sale contenido en el líquido a través de los espacios perivascuales hasta los espacios subaracnoideos. Al llegar a ellos, las proteínas pasan a circular con el LCR, para absorberse hacia las grandes venas cerebrales a través de las vellosidades aracnoideas. Por tanto, los espacios perivascuales en realidad constituyen un sistema linfático especializado para el encéfalo. Además de transportar líquido y proteínas, también sacan del encéfalo sustancias sólidas extrañas. Por ejemplo, siempre que hay una infección encefálica, los glóbulos blancos muertos y otros residuos infecciosos se expulsan por los espacios perivascuales (Guyton & Hall, 2011). Así, la entrada de leucocitos dentro del parénquima cerebral está controlada por diferentes componentes celulares a nivel de las vénulas postcapilares. La regulación de la entrada celular se lleva a cabo por la migración a través de dos estructuras distintas: la pared vascular y las células gliales subyacentes, con sus correspondientes membranas basales. De este

modo, esta “migración” supondría los dos pasos fundamentales de la neuroinflamación (Owens, 2008).

### **Función amortiguadora del LCR**

Una función fundamental del LCR consiste en amortiguar el encéfalo dentro de su bóveda sólida. El encéfalo y el LCR poseen aproximadamente la misma densidad específica (tan sólo difieren en un 4% más o menos), de modo que el encéfalo se limita a flotar en el seno del líquido. Por tanto, un golpe en la cabeza, si no es demasiado fuerte, desplaza todo el encéfalo a la vez que el cráneo, lo que evita que cualquier porción suya sufra una torsión transitoria por su acción.

### **Participación del LCR en el mantenimiento de la presión intracraneal (PIC)**

La presión normal del sistema del LCR en una persona tumbada en posición horizontal mide como promedio 130 mm de agua (10 mmHg), aunque puede bajar hasta 65 mm de agua o subir hasta 195 mm de agua incluso en una persona normal sana.

### **Regulación de la presión del LCR por las vellosidades aracnoideas.**

La velocidad normal de formación del LCR permanece muy constante, por lo que sus cambios rara vez constituyen un factor que influya en el control de la presión. En cambio, las vellosidades aracnoideas funcionan como válvulas que permiten la salida sin problemas del LCR y de su contenido hacia la sangre de los senos venosos mientras que impiden el retroceso de la sangre en un sentido opuesto. Normalmente, esta acción valvular de las vellosidades deja que el LCR comience a fluir hacia la sangre cuando su

presión supera en unos 1,5 mmHg a la de la sangre en los senos venosos. Después, si la presión del LCR todavía sube más, las válvulas se abren con mayor amplitud. En condiciones normales, esta variable casi nunca asciende más que unos pocos milímetros de mercurio por encima de la presión en el interior de los senos venosos cerebrales. Por el contrario, en los estados patológicos, a veces las vellosidades quedan bloqueadas por grandes partículas sólidas, por una fibrosis o por un exceso de células sanguíneas que se hayan filtrado hacia el LCR en los casos de una enfermedad cerebral. Tal bloqueo puede elevar la presión del LCR.

### **Medición de la presión del LCR.**

El procedimiento habitual para medir la presión del LCR es sencillo. En primer lugar, la persona se tumba en posición totalmente horizontal sobre su costado para que la presión del líquido en el conducto raquídeo sea idéntica a la que hay en la bóveda craneal. A continuación, se introduce una aguja de punción en la zona lumbar del conducto raquídeo por debajo del extremo inferior de la médula, y se conecta a un tubo vertical de vidrio cuyo extremo superior está abierto al aire. Se deja que el líquido del conducto vertebral suba por el tubo todo lo que pueda. Si asciende hasta una altura de 136 mm por encima del nivel de la aguja, se dice que su valor es de 136 mm de presión de agua o, dividiendo esta cifra por 13,6, que es la densidad específica del mercurio, de unos 10 mmHg de presión.

### **Hidrocefalia**

“Hidrocefalia” significa exceso de agua en la bóveda craneal. Este proceso suele dividirse en dos tipos: la hidrocefalia comunicante y la hidrocefalia no comunicante. En la primera, el líquido circula sin problemas desde el sistema ventricular hacia el espacio

subaracnoideo, mientras que en la segunda está bloqueada su salida fuera de uno de los ventrículos como mínimo. Normalmente el tipo no comunicante de hidrocefalia está ocasionado por un bloqueo en el acueducto de Silvio, a raíz de la atresia (o cierre) que se produce en muchos bebés antes del nacimiento, o del bloqueo por un tumor cerebral a cualquier edad. Como el líquido se forma en los plexos coroideos de los dos ventrículos laterales y del tercero, el volumen de estas tres cavidades crece mucho. Esto comprime el cerebro contra el cráneo convirtiéndolo en un delgado caparazón. En los RN, la elevación de la presión también hace que se hinche toda la cabeza debido a que los huesos del cráneo aún no se han fusionado. El tipo de hidrocefalia comunicante suele estar causado por el bloqueo que sufre el flujo de líquido en los espacios subaracnoideos en torno a las regiones basales del encéfalo o por el bloqueo de las vellosidades aracnoideas donde normalmente se produce su absorción hacia los senos venosos. Por tanto, se acumula tanto en el exterior del encéfalo como, en menor medida, dentro de los ventrículos. Esto también hará que la cabeza se hinche tremendamente si sucede en el período de lactancia, cuando el cráneo todavía es maleable y puede extenderse, aunque es capaz de dañar el encéfalo a cualquier edad. Un método para tratar los numerosos tipos de hidrocefalia consiste en la colocación quirúrgica de una derivación mediante un tubo de silicona que vaya desde uno de los ventrículos cerebrales hasta la cavidad peritoneal, donde el exceso de líquido puede absorberse hacia la sangre.

## **1.2 Barreras hematocefalorraquídea y hematoencefálica**

Ya se ha señalado que la concentración de varios componentes importantes del LCR no coincide con las del líquido extracelular en cualquier otro punto del cuerpo. Además, muchas sustancias moleculares grandes apenas consiguen pasar desde la sangre hacia el LCR o hacia los líquidos intersticiales del encéfalo, aunque estas

mismas sustancias salen con facilidad hacia los líquidos intersticiales habituales del organismo. Por tanto, se dice que existen barreras, llamadas barrera hematocefalorraquídea (BHC) y barrera hematoencefálica (BHE), que separan la sangre del LCR y del líquido encefálico, respectivamente (Guyton & Hall, 2011). Mientras que se considera que la BHE se localiza a nivel de las células endoteliales de la microvasculatura del SNC, la BHC queda localizada en las células epiteliales de los plexos coroideos. La función tanto secretora de LCR como de barrera de las células epiteliales de los plexos coroideos se lleva a cabo mediante la expresión de numerosos sistemas de transporte que permiten el transporte directo de iones y nutrientes al LCR y la retirada de agentes tóxicos fuera de éste. En caso de patología del SNC, ambas barreras se alteran, conduciendo a la formación de edema y al reclutamiento de células inflamatorias hacia el SNC (Engelhardt, 2009). Hay barreras en los plexos coroideos y en las membranas de los capilares tisulares prácticamente en cualquier región del parénquima cerebral excepto en algunas zonas del hipotálamo, la glándula pineal y el área postrema, donde las sustancias difunden sin tantos problemas hacia los espacios tisulares. La facilidad de difusión es notable en estas regiones porque poseen receptores sensitivos que responden a cambios específicos ocurridos en los líquidos corporales, como las variaciones de la osmolaridad y de la concentración de glucosa, así como otros receptores para hormonas peptídicas encargadas de regular la sed, como la angiotensina II. La BHE también contiene moléculas transportadoras específicas que facilitan el transporte de hormonas, como la leptina, desde la sangre hacia el hipotálamo, donde se unen a unos receptores específicos que controlan funciones como el apetito y la actividad del sistema nervioso simpático.

En general, las barreras BHC y BHE son muy permeables al agua, dióxido de carbono, oxígeno y la mayoría de sustancias liposolubles, como el alcohol y los

anestésicos; parcialmente permeables a electrólitos, como el sodio, el cloruro y el potasio, y casi totalmente impermeables a las proteínas plasmáticas y a la mayor parte de las moléculas orgánicas grandes no liposolubles. Por tanto, las barreras BHC y BHE muchas veces hacen que sea imposible lograr unas concentraciones eficaces de los medicamentos terapéuticos en el LCR o en el parénquima cerebral, como los anticuerpos proteicos y los fármacos no liposolubles. La causa de la baja permeabilidad que presentan las barreras BHC y BHE radica en el modo como están unidas entre sí las células endoteliales de los capilares en el tejido cerebral, mediante las denominadas “uniones intercelulares herméticas o estrechas”. Esto es, las membranas de las células endoteliales adyacentes están íntimamente fusionadas en vez de poseer grandes poros de hendidura entre ellas, como ocurre con la mayor parte del resto de capilares del organismo (Guyton & Hall, 2011). Se considera que la BHE del neonato es inmadura, presentando un aumento de la permeabilidad de los capilares endoteliales a ciertas macromoléculas (Rapoport, 1976; Seller, 1975 y 1975; Adinolfi, 1976).

### **Estructura de la barrera hematoencefálica**

La estructura básica de la BHE ha sido descrita hace más de 100 años. Desde entonces se han hecho muchos progresos en el intento de dilucidar los programas que gobiernan la biogénesis de las uniones estrechas y muchos de los principales componentes moleculares del complejo que conforma la unión estrecha endotelial, el cual constituye la principal barrera física paracelular que se ha identificado en la BHE (Bauer, 2014). Como consecuencia de estas peculiares uniones intercelulares la BHE restringe el paso de sustancias hidrofílicas a una ruta transcelular en lugar de tomar una ruta paracelular, como ocurre en otros territorios capilares. Además, las uniones intercelulares estrechas determinan la polaridad funcional de las células endoteliales,

resultando la división en un dominio apical y otro basal con diferente expresión de canales iónicos y transportadores a la cara luminal (frente al torrente sanguíneo) y abluminal (frente al líquido intersticial cerebral) de la membrana. La unidad funcional de la unión intercelular estrecha consiste en un complejo proteico que incluye 2 grupos de proteínas: proteínas transmembrana como las “occludinas”, “claudinas” y las “moléculas asociadas a la unión”, que abarcan el espacio intercelular y conectan células endoteliales adyacentes; y otro grupo de proteínas reguladoras y de soporte citoplásmico, como las proteínas “zónula ocludens”, que conectan las proteínas transmembrana con el citoesqueleto, e inician ciertos mecanismos de señales vía interacción proteína-proteína (Figura 4). La función principal de las occludinas dentro de la unión estrecha es reguladora (Huber, 2001; Hawkins y Davis, 2005). Las claudinas forman parte del “sello” o fijación primaria de la unión estrecha. Las “moléculas asociadas a la unión” probablemente median el ensamblaje precoz de membranas celulares adyacentes.

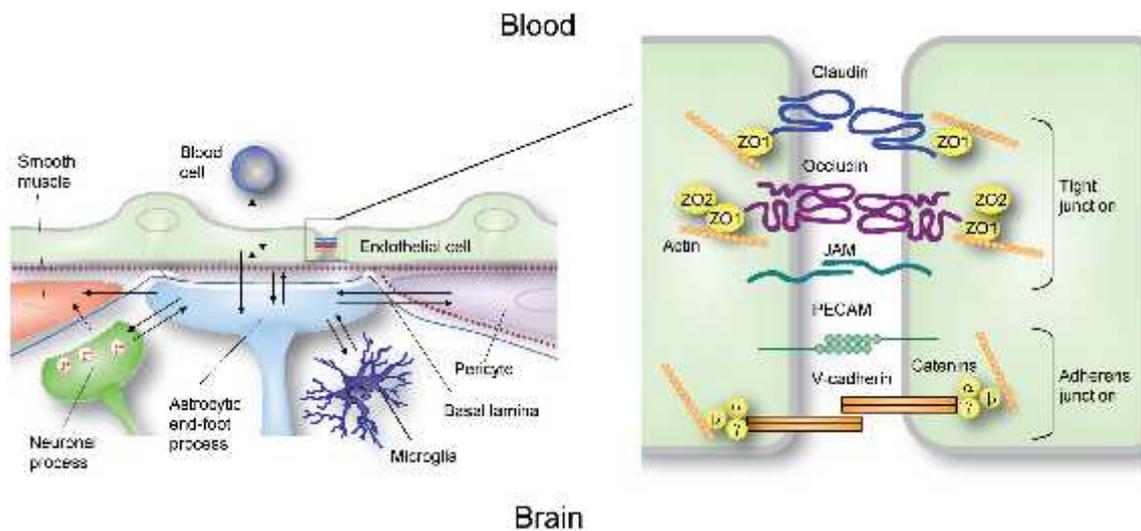


Figura 4: Estructura de la unidad neurovascular (izquierda) y de la unión intercelular estrecha (derecha) (Benarroch, 2012)

## **Funciones de la barrera hematoencefálica**

La BHE restringe el paso de iones y fluidos entre la sangre y el cerebro, aporta nutrientes esenciales para el parénquima cerebral y participa en la eliminación de productos potencialmente tóxicos y de desecho. Las células endoteliales cerebrales que forma la BHE expresan proteínas de transporte, la mayoría de las cuales poseen una distribución polarizada con expresión en la cara luminal o abluminal. Así mismo existen receptores que median el paso transendotelial de péptidos y proteínas, y enzimas que metabolizan neurotransmisores o sus precursores (Figura 5). **Transporte iónico:** La BHE posee una alta densidad de mitocondrias debido a las altas demandas energéticas el transporte activo ATP-dependiente de iones sodio, potasio, cloro, hidrógeno, bicarbonato y calcio. **Mediado por transportador:** Miembros de la superfamilia de “transportadores solubles” llevan a cabo el transporte específico de nutrientes como glucosa, aminoácidos, ácidos monocarboxílicos, nucleósidos, purinas, aminas y vitaminas a través de las células endoteliales. Un ejemplo importante es el transportador de glucosa GLUT1, que se expresa a una mayor concentración en la cara abluminal que en la luminal y media el transporte facilitado de glucosa a través de la BHE. La expresión de GLUT1 está controlada por el “factor-1 hipoxia-inducible” (HIF-1) y aumenta en el caso de hipoxia y disponibilidad reducida de sustrato en plasma (Zlokovic, 2008). **Transportadores ATP-binding cassette (ABC) y transporte por flujo:** Los transportadores tipo ABC median el flujo activo de moléculas liposolubles hacia el exterior del endotelio capilar cerebral y sistema nervioso central (Dauchy, 2008). Estos transportadores tienen una función protectora del SNC retirando moléculas endógenas o xenobióticas potencialmente neurotóxicas, o bien reduciendo la penetración de determinadas drogas dentro del SNC. Un importante ejemplo es la P-

glicoproteína o MDR1 (multidrug resistant protein 1, que se expresa en la cara luminal y en menor medida en la abluminal. Ciertos antiepilépticos son transportados de este modo (Aronica, 2012; Zhang, 2012). **Transporte de péptidos y proteínas:** Las células endoteliales de la BHE expresan ciertos sistemas de transporte para péptidos neuroactivos, como arginina-vasopresina, encefalinas, citoquinas y quimioquinas. Las proteínas grandes, como la transferrina, lipoproteínas de baja densidad, leptina, inmunoglobulina G, insulina y factor de crecimiento insulin-like son transportadas mediante transcitosis mediada por receptor para atravesar la BHE (Figura 5) (Zlokovic, 2008). Este proceso requiere la unión de estas proteínas a su receptor específico en la membrana celular, seguido de endocitosis del complejo ligando-receptor, paso al citoplasma y exocitosis al polo opuesto de la célula. Otro mecanismo de transporte de macromoléculas es vía caveolas, las cuales son vesículas que se forman a partir de balsas lipídicas de la membrana plasmática que controla la permeabilidad transcelular de la BHE. **Transporte enzimático:** las células endoteliales de la BHE expresan enzimas cuyo objetivo son moléculas endógenas y exógenas, incluidos neurotransmisores como catecolaminas y encefalinas y otros mediadores químicos como los leucotrienos. Ejemplos que utilizan este tipo de transporte son la monoaminoxidasa, gammaglutamil transpeptidasa, enzima convertidora de angiotensina y ecto o endopeptidasas (Black, 1994; Brownson, 1994). **Migración transendotelial de leucocitos circulantes:** La información bidireccional entre la célula inmune y el endotelio constituye un elemento esencial para el normal funcionamiento del sistema inmunitario, así como en el caso de un proceso inflamatorio. Los monocitos circulantes son capaces de penetrar la BHE intacta mediante un proceso de diapédesis a través del citoplasma de las células endoteliales; estos monocitos poseen funciones complementarias a las de la microglia de la zona, o incluso se puede transformar fenotípicamente en microglia. El patrón y

ruta de la migración leucocitaria a través de la BHE viene determinado por interacciones entre las moléculas de adhesión a las células endoteliales (CAMs), como la intercelular (ICAM-1), la vascular (VCAM-1) y la plaquetaria (PECAM), e integrinas expresadas en los leucocitos, especialmente  $\alpha 4$  y  $\beta 2$ -integrinas (Greenwood, 2011).

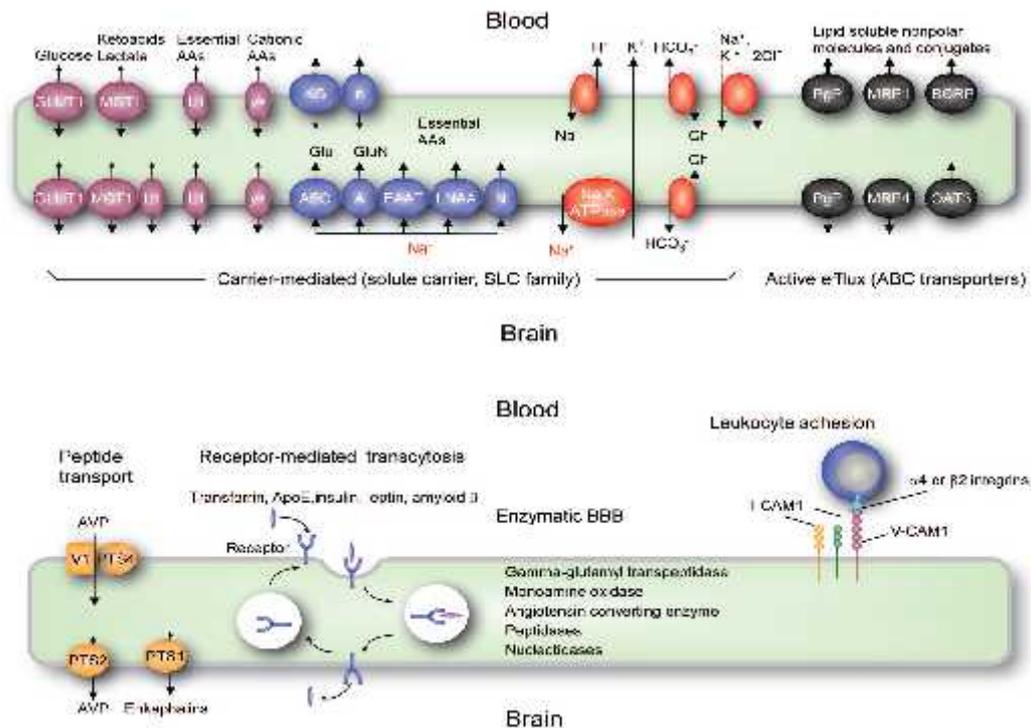


Figura 5. Mecanismos de transporte de la BHE. (Benarroch, 2012).

Las uniones estrechas son ahora consideradas estructuras dinámicas donde múltiples rutas de señales convergen, adaptando el lecho vascular cerebral de la BHE con un alto grado de plasticidad en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos. Aparte de la adhesión célula a célula, procesos como la polarización celular, reordenamientos del citoesqueleto, adhesión a la matriz extracelular mediada por integrinas y conducción polarizada son fundamentales para el funcionamiento fisiológico de la BHE. Ya que para el tratamiento de muchas enfermedades neurológicas constituye un impedimento la dificultad para la entrada a través de la BHE

de determinados fármacos, sería de gran utilidad conseguir una modulación transitoria para la apertura de las uniones estrechas intercelulares. Así, indudablemente un mayor conocimiento de la compleja estructura y fisiología de las uniones estrechas endoteliales a nivel de la BHE aportaría nuevas soluciones para la práctica clínica (Bauer, 2014). Aún quedan por responder algunas cuestiones clave para la comprensión del normal desarrollo y funcionamiento normal de la BHE en humanos, por ejemplo, la expresión de ciertas claudinas en el endotelio cerebral de fetos, prematuros y neonatos a término todavía no se ha constatado. La morfología de la cara gliovascular de la matriz germinal comparada con otras áreas del córtex cerebral en humanos aún no ha sido adecuadamente estudiada, lo cual sería clave para comprender por qué los vasos sanguíneos de la matriz germinal son tan frágiles y tan propensos al sangrado en prematuros. Además, existen otras cuestiones pendientes de estudio en profundidad: cómo se ensamblan exactamente las uniones estrechas intercelulares, cómo se regulan en determinadas situaciones fisiológicas, cómo interactúan con ciertos mediadores, neurotransmisores y fármacos, cómo se alteran según la patología... (Ballabh, 2004).

### **Correlaciones clínicas con la alteración de la BHE**

#### ***Patofisiología de la apertura de la BHE:***

Como ya se ha mencionado, en condiciones fisiológicas la BHE es relativamente impermeable. En condiciones patológicas, existen ciertos mediadores químicos que al ser liberados aumentan la permeabilidad de la BHE. Algunos de estos mediadores de la apertura de la BHE han sido estudiados en experimentos tanto in vivo como in vitro, e incluyen aspartato, glutamato, taurina, ATP, endotelin-1, NO, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  e interleukina- $\alpha$ , que son producidos por los astrocitos (Abbott, 2000, 2002; Chen, 2000; Kustova, 1999; Magistretti, 1999). Otros agentes humorales en los que se

ha demostrado que aumentan la permeabilidad de la BHE son bradiquinina, serotonina, histamina, trombina, uridín trifosfato (UTP), uridín monofosfato (UMP), SP, ácido quinolínico, factor activador plaquetario y radicales libres (Abbott, 2002; Annunziata, 1998; Pan, 2001; St'astny, 2000). Algunos de estos agentes son liberados por el endotelio, y el mismo endotelio responde ante algunos de estos agentes liberados. En condiciones fisiológicas, las terminaciones nerviosas de las neuronas discurren cercanas a los vasos sanguíneos donde son liberados estos mediadores, como histamina, SP y glutamato, que influyen en la permeabilidad de la BHE (Ballabh, 2003).

### ***Estados patológicos asociados con disfunción de la BHE***

La disfunción de la BHE es un componente patofisiológico de una amplia variedad de desórdenes neurológicos. Entre estos se incluyen: traumatismo cerebral (Tomkins, 2008; Nag, 2011), infarto (Baeten, 2011; Yang, 2011), epilepsia (Aronica, 2012, Friedman, 2011; Fabene, 2008), esclerosis múltiple (Mandel, 2011; Simka, 2009), neuromielitis óptica (Shimizu, 2012), hemorragia de la matriz germinal (Ballabh, 2003; Ghazi-Birry, 1997), encefalopatía por VIH (Roberts, 2010; Xu, 2012; Strazza, 2011; Yang, 2009; Eugenin, 2006), glioblastoma (Ishihara, 2008; Warth, 2004), enfermedad de Alzheimer y otros procesos neurodegenerativos (Aluise, 2008; Zlokovic, 2008 y 2011, Grammas, 2011), fallo hepático (Skowronska, 2012) y enfermedades por depósito lisosomal (Begley, 2008).

Los distintos mecanismos de disfunción de la BHE incluyen la disrupción de las uniones intercelulares estrechas, alteración en la expresión y función de transportadores de membrana o enzimas, aumento del paso de células inflamatorias desde la sangre hasta el SNC, y disfunción de los astrocitos y otros componentes de la unidad neuromuscular. La activación de la microglia exacerba la evolución de la enfermedad.

Estas alteraciones conllevan edema vasogénico, acumulación de sustancias tóxicas en el líquido intersticial cerebral, estrés oxidativo, deterioro de la homeostasis hídrica e iónica, desacoplamiento de las unidades neurovascular y neurometabólica, angiogénesis aberrante y neuroinflamación, todas estas alteraciones a menudo combinadas unas con otras (Coisne, 2012; Willis, 2011; Semple, 2010; Takata, 2011).

### ***Transferencia de fármacos hasta el SNC:***

La exhaustiva regulación del entorno del SNC llevada a cabo gracias a la BHE proporciona un serio obstáculo para la entrada y actuación de los fármacos en él. Algunas técnicas han sido investigadas para conseguir que ciertos fármacos atraviesen la BHE, incluídas la disrupción física de la BHE, modificaciones en la estructura de los propios fármacos, y “troyanos” que utilizan propiedades de transporte propias de la BHE (Hossain, 2010; Soni, 2010).

El shock osmótico inducido, mediante la inyección carotídea de una solución hiperosmótica de manitol, ha demostrado aumentar la permeabilidad a la entrada al SNC de ciertos agentes terapéuticos para el tratamiento de tumores cerebrales. Aunque efectivo en cuanto a la disrupción de la BHE, este proceso sin embargo induce convulsiones como efecto secundario, de ahí la limitación en su uso (Haluska, 2004; Marchi, 2007, Siegal, 2000). Para pequeñas moléculas que son expulsadas a través de transportadores de la BHE, se han investigado modificaciones en algunos de sus componentes, retirándoles el sustrato específico de unión a las MDR1 y otros transportadores, así como el desarrollo de inhibidores de los transportadores MDR1 que puedan ser coadministrados con el fármaco activo. Ejemplos de estos inhibidores son el verapamilo, quinidina, ciclosporina A, valsopodar y biricodar, que han demostrado más o menos éxito en cuanto a selectividad y potencia (Loscher, 2005). También se han

empleado sistemas de transporte endógeno “piratas” mediante la modificación de algunos de sus componentes. Es el caso de la L-Dopa para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En el caso de moléculas grandes, como son anticuerpos y otras proteínas, han utilizado como transporte transcitosis endógena mediada por receptor (por ejemplo, el receptor de insulina) (Boado, 2007). Así, estos anticuerpos han sido utilizados para transportar moléculas, proteínas quiméricas, o grandes nanopartículas, incluidos liposomas, micelas, o nanocápsulas conteniendo compuestos activos (Roger, 2011; Yang, 2010). Un problema común con estos avances es que el que un compuesto concreto consiga atravesar el endotelio de la BHE, esto no garantiza que consiga alcanzar su tipo celular objetivo, neuronal o glial. El compuesto aún necesitará atravesar la membrana basal, los macrófagos perivasculares y los podocitos astrocitarios, y sólo entonces podrán dirigirse a su objetivo celular. Recientes evidencias sugieren que disminuyendo la afinidad de un anticuerpo dirigido contra el receptor de transferrina permite una mayor liberación del anticuerpo a la cara abluminal del vaso y así introducirse en el parénquima (Yu, 2011).

### **1.3 Estudio del LCR**

El estudio del LCR resulta altamente interesante para el diagnóstico de distintas patologías, de las que las más importantes por su frecuencia y por requerir de una actuación urgente son las que suponen algún tipo de infección meníngea y/o encefálica. Para ello se requiere la realización de una punción para acceder a los espacios en los que está albergado, es decir, los ventrículos y el espacio subaracnoideo. La que se practica

habitualmente es la punción lumbar. En el siguiente apartado veremos la técnica correcta para su realización en lactantes y niños, según las últimas evidencias.

Para el estudio del LCR nos interesa obtener información sobre la presión, el aspecto y la composición:

a) Presión: Se puede medir con un manómetro acoplado al trócar, aunque habitualmente se mide grosso modo observando cómo fluye del trócar. En condiciones normales, este flujo es a modo de goteo continuo, mientras que cuando la presión aumenta fluye a chorro, y si está disminuída gotea muy lentamente o incluso no fluye. La presión estará aumentada en los casos de síndrome de hipertensión intracraneal, puesto que el aumento de presión dentro del cráneo se transmite al espacio subaracnoideo perimedular. La presión puede estar disminuída cuando existe bloqueo de este espacio en casos de síndrome de compresión medular.

b) Aspecto: Recogido en un tubo de ensayo, el LCR, que en condiciones normales es claro y transparente (“como agua de roca”, según la expresión clásica), en situaciones patológicas puede tener las siguientes características:

- opalino o turbio: Tiene este aspecto cuando contiene leucocitos polimorfonucleares en las meningitis bacterianas.

- rojo: Debe este color a la presencia de sangre procedente de la rotura de aneurismas de las arterias del polígono de Willis (situado precisamente en el espacio subaracnoideo de la base del cráneo), o de hemorragias en el seno del cerebro si se abren paso a los ventrículos (muy frecuentes en el prematuro y más a mayor prematuridad las hemorragias de la matriz germinal). De todos modos la causa más frecuente en la obtención de un LCR rojo tras punción lumbar es una mala técnica, con la obtención de sangre no procedente del espacio subaracnoideo, o bien LCR teñido de ella.

- xantocrómico: Significa que es amarillento, color que adquiere cuando ha pasado algún tiempo desde la incorporación de sangre y, por tanto, la hemoglobina se ha transformado, o bien cuando es muy rico en proteínas, que es lo que ocurre en el síndrome de compresión medular con bloqueo del espacio subaracnoideo.

c) Composición: al respecto interesa conocer datos citológicos, bioquímicos, y bacteriológicos y serológicos. Más adelante conoceremos las peculiaridades de estos valores en el neonato, al seguir siendo algo controvertidos.

*Datos citológicos:* El LCR normal en el adulto contiene sólo 1-3 células / mm<sup>3</sup>. El aumento o pleocitosis es propio de las meningitis y meningoencefalitis. Es a base de leucocitos polimorfonucleares en las meningitis bacterianas en general y de linfocitos en la tuberculosa y en las víricas. Estas células proceden de la sangre y pasan al LCR porque debido a la inflamación aumenta la permeabilidad capilar de la BHC. También pueden observarse células tumorales desprendidas de las meninges cuando están infiltradas.

*Datos bioquímicos:* los parámetros solicitados habitualmente son proteínas y glucosa. La hiperproteíorraquia (> 0,4 g/l) se observa en meningitis, en algunos tumores y en el síndrome de compresión medular. En general, las proteínas proceden de la sangre y aumentan, al igual que las células, por el aumento de la permeabilidad de la BHC. En el caso del síndrome de compresión medular las proteínas aumentan por concentración en el líquido que queda aislado por debajo del bloqueo. Así, la regla general es que aumenten paralelamente las proteínas y las células. Cuando aumentan las proteínas y no las células se habla de disociación albúmino-citológica, que es característica de las polineuropatías, en las que la lesión se extiende a las raíces (incluidas en el espacio subaracnoideo), y del síndrome de compresión medular. Con respecto a la glucosa, tiene interés la hipogluorraquia (valores de glucosa por debajo

del 60% de la sanguínea), que es constante en las meningitis bacterianas y tuberculosa. Otros datos bioquímicos que pueden interesar según la situación serían inmunoglobulinas, enzimas, neurotransmisores...etc.

*Datos bacteriológicos y serológicos:* Se pueden aplicar al LCR las mismas técnicas que se utilizan en la sangre y en otros líquidos biológicos para identificar los agentes vivos causantes de la inflamación de las meninges y de los centros nerviosos (Castro del Pozo, 1996).

### **Punción lumbar. Técnica**

La punción lumbar (PL) es una técnica mediante la cual se accede al espacio subaracnoideo espinal a nivel de la cisterna lumbar utilizando una aguja. En la mayoría de las ocasiones, la PL se realiza para extraer una muestra de LCR con fines diagnósticos, siendo de gran utilidad en enfermedades del SNC (meningitis, encefalitis, enfermedad de Guillain-Barré, enfermedades desmielinizantes, infiltración leucémica, hemorragia subaracnoidea, etc...) (Straus, 2006), aunque también se utiliza para la administración de medicación intratecal, fundamentalmente en el tratamiento de enfermedades oncológicas con infiltración del sistema nervioso central. Esta técnica fue descrita por primera vez en 1891 por Quincke (Quincke, 1891 y 1902) y se utiliza con gran frecuencia en pediatría. Las contraindicaciones de este procedimiento son escasas: hipertensión intracraneal, infección local del punto de punción, trombopenia e inestabilidad hemodinámica. La PL es un procedimiento invasivo no exento de complicaciones, algunas de ellas en relación con una mala técnica. Las más frecuentes son el dolor de espalda en el lugar de la punción y la cefalea pospunción. Son más raros el dolor neurálgico de un miembro inferior durante el procedimiento, la hemorragia epidural, subdural o subaracnoidea, la herniación cerebral (cuando se realiza una PL en

un paciente con hipertensión intracraneal), los tumores raquídeos epidermoides (debidos al uso de agujas sin fiador), los abscesos retroperitoneales (por goteo de LCR infectado) o la hipoxia en recién nacidos (por obstrucción de la vía aérea al mantener la posición de flexión cervical) (Reynolds, 2008; Per, 2009, Lee, 2007; Chordas, 2001). La técnica llevada a cabo con precisión y experiencia a la hora de realizar una PL es fundamental. Storch de Gracia y colaboradores han recogido en la siguiente tabla las últimas evidencias sobre la manera más óptima de realizar una punción lumbar, paso a paso (Tabla 1).

### **Análisis citoquímico del LCR en el neonato**

El análisis del LCR obtenido en la mayoría de las ocasiones por punción lumbar constituye una gran ayuda para los clínicos a la hora de identificar con carácter de urgencia pacientes con meningitis/encefalitis. Por lo tanto, requiere del conocimiento de valores de referencia precisos, especialmente del recuento de glóbulos blancos o leucocitos. Determinar los valores aceptados como normales de leucocitos en neonatos supone un reto desde tiempo atrás, debido a que no es ético realizar una punción lumbar a un neonato sano y asintomático, tratándose de una técnica dolorosa y con potenciales complicaciones, y más aún cuando por si mismos no pueden otorgar un consentimiento informado.

Tabla 1: Técnica de la PL en pediatría (Storch De Gracia , 2012).

<b>Preparación-control de la ansiedad</b>	<b>Sedación no farmacológica:</b> - Ambiente tranquilo.- Padre o madre presente.- Si el niño tiene edad para comprender, se le debe explicar el objetivo y el desarrollo de la prueba. <b>Sedación farmacológica:</b> - <u>Pacientes colaboradores</u> (mayores de 4-6 años): óxido nitroso al 50% con oxígeno inhalado- <u>Pacientes no colaboradores</u> : midazolam (oral, intranasal o intravenoso) o ketamina (intramuscular o intravenosa) (Doyle, 2008; Shavit, 2006).
<b>Control del dolor (anestesia local)</b>	- Crema de lidocaína al 2,5% asociada a prilocaína al 2,5%. - Cloruro de etilo
<b>Posición</b>	En decúbito lateral o sedestación
<b>Asepsia</b>	Se aplica un antiséptico en la parte inferior de la espalda, con un movimiento circular desde el centro hacia la periferia, incluyendo ambos flancos, el inicio de los glúteos y ambas crestas ilíacas. Se debe establecer un campo estéril
<b>Tipo de aguja</b>	<b>Agujas de tipo Quincke (traumáticas):</b> - El orificio es distal con un bisel afilado- Son las más utilizadas en nuestro medio <b>Agujas de tipo Whitacre y tipo Sprotte (atraumáticas):</b> - El orificio está en un lateral de la aguja- La punta es roma, sin filo- Asocian menor incidencia de CPP (Strupp, 2008).
<b>Tamaño de la aguja</b>	Se ha de utilizar la aguja de menor tamaño que permita extraer la muestra de LCR de forma adecuada (22 G, generalmente)
<b>Punto de entrada</b>	Se ha de buscar el punto de entrada palpando el espacio interespinoso que queda por debajo de la línea que une las dos crestas ilíacas, que se correspondería con el cuerpo vertebral L4 o el espacio intervertebral L4-L5. Se debe puncionar en el primer o segundo espacio intervertebral inmediatamente inferior a esta línea, que correspondería con los espacios L4-L5 o L5-S1, ambos inferiores a la terminación de la médula espinal en el niño (en el nivel L3 aproximadamente) (Boon, 2004).
<b>Introducción de la aguja</b>	<b>Orientación del bisel de la aguja con las agujas tipo Quincke:</b> paralelo a las fibras longitudinales de la duramadre, para evitar el desarrollo de cefalea postraumática (Richman, 2006; Ansaloni, 2000; Dooner, 1989; Fink, 1989):- <u>Paciente sentado</u> : bisel hacia un lado - <u>Paciente en decúbito lateral</u> : bisel hacia arriba o hacia abajo. Se ha de insertar la aguja con una inclinación aproximada de 15° en dirección al ombligo. <b>Ruidos o sensaciones percibidas con el avance de la aguja:</b> se corresponden con la perforación de distintas estructuras. La más constante aparece al atravesar el ligamento amarillo (que une las láminas vertebrales). Coincide con una disminución de la resistencia al avance de la aguja. En ese momento se retira el fiador para comprobar si hay flujo de LCR a su través
<b>Recogida de muestras</b>	La muestra debe ser recogida directamente en un tubo estéril. Nunca se debe aspirar
<b>Retirada de la aguja</b>	Al terminar, se debe reinsertar el fiador siempre antes de retirar la aguja

Así, clásicamente en todos los estudios se evalúan los valores considerados normales en RN con factores de riesgo y/o cierta sintomatología con indicación clara de realización de punción lumbar, en los que finalmente se descarta infección meníngea o encefálica. En esto se basa la amplia variedad de referencias bibliográficas disponibles para ayudar al clínico a interpretar los valores de leucocitos en LCR, entre ellos libros de texto y manuales de pediatría general (Behrman, 2004; McMillan, 2006; Robertson, 2005), de enfermedades infecciosas (Feigin, 2004; Remington, 2006), medicina hospitalaria (Frank, 2005; Perkin, 2008; Zaoutis, 2007), medicina de urgencias (Barem, 2008; Fleisher, 2006), neonatología (Taeusch, 1998), y neurología (Menkes, 2000; Swaiman, 1999). Estos parámetros suelen estar basados en otros textos de referencia o en estudios con importantes limitaciones (Tabla 2). En los siete estudios que se muestran (de 1925 a 1968) parece haber acuerdo general en que la media del recuento de leucocitos en LCR de RN es de 6-7 células/mm<sup>3</sup>.

Reference	No. infants	Age	CSF cells/mm <sup>3</sup>	
			Mean	Range
Roberts (1925) <sup>a</sup>	423	1 day	6.3	2-17
Wailiz (1928) <sup>a</sup>	50	0-2 wk	NR	5-20
Samsou (1931) <sup>a</sup>	NR	0-2 wk	4	
		3-4 wk	3 1/3	1-6 2/3
		2 wks-3 mo	3	0-5
		3-6 mo	1 1/3	0-3 1/3
Otila (1948) <sup>a</sup>	21 (P) <sup>b</sup>	0-1 wk	9	NR
		1-2 wk	13	NR
		2-4 wk	9	NR
		2 wks-3 mo		1-4
Wyers and Bakker (1954) <sup>a</sup>	NR	1 day	8.3	0-29
Widell (1958) <sup>a</sup>	NR	0-1 wk	8.1	
		0-2 wk	7.5	0-15
Naidoo (1968) <sup>a</sup>	35 (T) <sup>c</sup>	1 day	5	NR
		1 wk	3	NR

NR = not recorded.  
\*(P) = Preterm babies.  
|(T) = Term babies.

Tabla 2: Primeros estudios de recuento de leucocitos en LCR de RN (Sarff, 1976).

Así, ciertos estudios disponibles incluyen punciones traumáticas (Stewart, 1928; Widell, 1958; Naidoo, 1968; Portnoy, 1985; Sarff, 1976; Roberts, 1925; Wolf, 1961), convulsiones (Naidoo, 1968), sepsis (Nascimento-Carvalho, 1998) e infecciones congénitas (Roberts, 1925; Fielkow, 1991).

Los valores que continúan teniendo vigencia como más aceptados internacionalmente como “normales” son los publicados por Sarff et al (The Journal of Pediatrics, 1976). Estudiaron los hallazgos del LCR de 117 RN de alto riesgo sin evidencia de enfermedad bacteriana o vírica del SNC, comparando estos valores con los obtenidos en la valoración inicial del LCR de RN con meningitis bacteriana. El grupo de alto riesgo se constituyó por circunstancias tales como rotura prolongada de membranas, prematuridad, corioamnionitis, ictericia inexplicada, desprendimiento de placenta, fiebre materna o toxemia. De los 132 sujetos iniciales se excluyeron 15 por punción francamente hemorrágica (4), serología positiva a sífilis (7) y demostración microbiológica de meningitis bacteriana o vírica (4). Los 117 RN incluídos en el estudio demostraron cultivo de sangre, orina y LCR estéril, además de no presentar sintomatología alguna compatible con infección vírica o bacteriana. De los 117 RN incluídos, 87 eran RNT, 28 RNPT con PAEG, y 2 RNPT con BPEG. 111 de los 117 RN eran menores de 7 días de edad. Se comparó este grupo de alto riesgo con un grupo de 135 RN con infección bacteriana: 98 con meningitis por gram negativo, 21 con meningitis por streptococo grupo B, y 16 con sepsis sin meningitis. Los resultados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 3) (Sarff , 1976).

	<i>Term</i>	<i>Preterm</i>
WBC count (cells/mm <sup>3</sup> )		
No. of infants	87	30
Mean	8.2	9.0
Median	5	6
SD	7.1	8.2
Range	0-32	0-29
± 2 SD	0-22.4	0-25.4
Percentage PMN*	61.3%	57.2%
Protein (mg/dl)		
No. of infants	35	17
Mean	90	115
Range	20-170	65-150
Glucose (mg/dl)		
No. of infants	51	23
Mean	52	50
Range	34-119	24-63
CSF/blood glucose (%)		
No. of infants	51	23
Mean	81	74
Range	44-248	55-105

Tabla 3: Parámetros obtenidos en LCR para RN de alto riesgo sin meningitis (Sarff, 1976).

Se aprecia que la media de leucocitos en LCR para los 117 RN de alto riesgo fue de 8,4 células / mm<sup>3</sup>, lo cual es concordante con lo obtenido previamente para RN sanos (Roberts, 1925; Waitz, 1928; Samson, 1931; Otila, 1948; Wyers, 1954; Widell, 1958; Naidoo, 1968). 2DS sobre la media resultaron ser 23 células / mm<sup>3</sup>, y 3DS 31 células / mm<sup>3</sup>, que incluye el 99% de valores. Se observó un número decreciente en la celularidad en los RNT durante la primera semana de vida, y decreciente en los RNPT durante el mismo período, al igual que en el estudio previo de Otila E. (Otila, 1948). Con respecto a los valores de proteínas, hay acuerdo general en todos estos estudios en que estos valores son mayores en RN que en lactantes mayores y niños. El contenido de glucosa en LCR en relación a la glucosa sanguínea es proporcionalmente mayor en RN que en edades posteriores. Se detectaron en este estudio de Sarff valores de glucosa en LCR de entre el 75 y 80% de la glucosa sanguínea (al igual que lo detectado en estudios

previos), lo cual nuevamente es considerablemente más elevado que los valores del 40 al 60% para niños y adultos.

Las razones por las cuales los niveles de células, glucosa y proteínas son más elevadas en RN (tanto sanos como de alto riesgo) que en lactantes mayores, niños y adultos permanecen aún desconocidas. Originariamente se postuló que podría ser debido a pequeñas hemorragias cerebrales o infecciones virales o protozoarias ocultas (Roberts, 1925), aunque esto parece descartado. Como ya se ha comentado en el apartado previo, existen indicios de que pueda ser debido a un aumento de la permeabilidad de la BHE a estas edades tempranas. Además, esta tendencia parece agudizarse conforme disminuye la edad gestacional. De todos modos, se precisan más estudios para considerar cierta esta teoría.

En el estudio de Sarff, al comparar con el grupo de primera evaluación de RN con meningitis bacteriana, quedó manifiesto que los valores de LCR estaban claramente alterados, muy por encima de los límites superiores establecidos como normales (Figura 6). Tan sólo un RN con meningitis de los 119 evaluados presentó en la primera evaluación un LCR completamente normal (encontrándose ya francamente alterado en las siguientes).

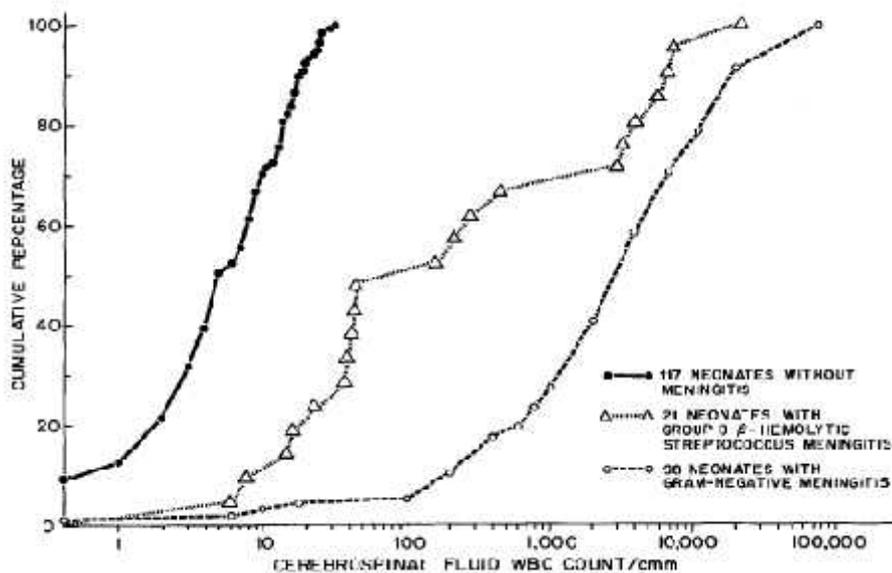


Figura 6: Comparación del recuento de leucocitos en LCR de RN con y sin meningitis (Sarff, 1976)

Para recién nacidos de muy bajo peso (RNMBP) los límites de celularidad, glucosa y proteínas en LCR clásicamente considerados son los publicados por Rodríguez et al (Rodríguez, 1990). Estudiaron el LCR de 43 RNMBP (<1500 g) obtenidos en las primeras 12 semanas de vida. Como criterios de inclusión, habían de ser RN de peso adecuado para la edad gestacional, con cultivo de LCR negativo para bacterias y sin evidencia de sangrado intracraneal mediante ecografía. Obtuvieron los resultados que se muestran, según peso, edad cronológica y edad postconcepcional (Tablas 4, 5, 6 y 7).

	Group 1 ( $\leq 1000$ gm) (n = 38*)		Group 2 (1001-1500 gm) (n = 33*)		p
	Mean $\pm$ SD	Range	Mean	Range	
Birth weight (gm)	763 $\pm$ 115	550-980	1278 $\pm$ 152	1020-1500	
Gestational age (wk)	26 $\pm$ 1.3	24-28	29 $\pm$ 1.4	27-35	
Leukocytes/mm <sup>3</sup>	4 $\pm$ 3	0-14	6 $\pm$ 9	0-41	NS
Erythrocytes/mm <sup>3</sup>	1027 $\pm$ 1270	0-19,050	786 $\pm$ 1873	0-9750	
PMN leukocytes (%)	6 $\pm$ 15	0-66	9 $\pm$ 17	0-60	NS
MN leukocytes (%)	66 $\pm$ 30	34-100	85 $\pm$ 28	13-100	
Glucose (mg/dl)	61 $\pm$ 34	29-217	59 $\pm$ 21	31-109	NS
Protein (mg/dl)	150 $\pm$ 56	55-370	132 $\pm$ 43	45-227	NS

NS, Not significant ( $p > 0.05$ ); MN, mononuclear.

\*Number of CSF specimens.

Tabla 4: Valores de leucocitos en LCR de RNMBP según el peso al nacimiento (Rodríguez, 1990)

	Postnatal age (days)					
	0-7 (6 infants; n = 6*)		8-28 (12 infants; n = 17)		29-84 (10 infants; n = 15)	
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
Birth weight (g)	822 ± 176	630-980	752 ± 112	550-970	750 ± 120	550-907
Gestational age at birth (wk)	26 ± 1.7	24-27	26 ± 1.5	24-28	26 ± 1.0	24-27
Leukocytes/mm <sup>3</sup>	3 ± 3	1-8	4 ± 4	0-14	4 ± 2	0-11
Erythrocytes/mm <sup>3</sup>	335 ± 709	0-1780	1465 ± 4062	0-19,050	508 ± 1843	0-850
PMN (%)	11 ± 20	0-50	8 ± 17	0-66	2 ± 9	0-36
Glucose (mg/dl)	70 ± 17	41-89	68 ± 48	33-217	49 ± 22	29-50
Protein (mg/dl)	162 ± 37	115-222	159 ± 77	95-370	137 ± 61	76-260

\*Number of CSF specimens.

Tabla 5: Valores de leucocitos en LCR de RNMBP <1.000g según la edad cronológica (Rodríguez, 1990)

	Postnatal age (days)					
	0-7 (8 infants; n = 8*)		8-28 (11 infants; n = 14)		29-84 (6 infants; n = 11)	
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
Birth weight (g)	1423 ± 107	1180-1530	1245 ± 167	020-1480	211 ± 86	1080-1300
Gestational age at birth (wk)	31 ± 1.5	28-33	29 ± 1.2	27-31	29 ± 0.7	27-29
Leukocytes/mm <sup>3</sup>	4 ± 4	1-10	7 ± 11	0-44	8 ± 8	0-27
Erythrocytes/mm <sup>3</sup>	407 ± 853	0-2450	1101 ± 2643	0-9750	661 ± 1198	0-3800
PMN (%)	4 ± 10	0-28	10 ± 19	0-60	11 ± 19	0-18
Glucose (mg/dl)	74 ± 19†	50-96	59 ± 23	39-109	47 ± 13	31-76
Protein (mg/dl)	136 ± 35	85-176	137 ± 46	54-227	122 ± 47	45-187

\*Number of CSF specimens.

†p < 0.001. Infants up to 7 days of age had significantly higher value compared with those older than 27 days.

Tabla 6: Valores de leucocitos en LCR de RNMBP 1.001-1.500 g según la edad cronológica (Rodríguez, 1990).

Postconceptional age (wk)	CSF leukocytes/mm <sup>3</sup> ± SD (range)	PMN (%) ± SD (range)	Glucose (mg/dl) ± SD (range)	Protein (mg/dl) ± SD (range)
26-28 (n = 17)	6 ± 10 (0-44)	6 ± 17 (0-50)	85 ± 35* (41-217)	177 ± 60† (108-370)
29-31 (n = 23)	5 ± 4 (0-14)	10 ± 19 (0-66)	54 ± 18 (33-94)	144 ± 40 (54-227)
32-34 (n = 19)	4 ± 5 (1-11)	4 ± 11 (0-36)	55 ± 21 (29-109)	142 ± 49 (54-260)
35-37 (n = 8)	6 ± 7 (2-22)	5 ± 14 (0-40)	56 ± 21 (31-90)	109 ± 23 (45-187)
38-40 (n = 5)	9 ± 9 (0-23)	16 ± 23 (0-48)	44 ± 10 (32-57)	117 ± 23 (57-148)

n, Number of CSF specimens.

\*Group at 26 to 28 weeks had significantly greater glucose and protein than the other four groups (p < 0.04).

Tabla 7: Valores de leucocitos en LCR de RNMBP según la edad postconcepcional. (Rodríguez, 1990)

La media de leucocitos en LCR observada, en este caso para RNMBP, fue de 5 células / mm<sup>3</sup>, con un máximo en el rango de 44 células / mm<sup>3</sup>, lo cual es comparable a lo obtenido en estudios previos para RNPT sanos y RNT (Sarff, 1975; Naidoo, 1968). En este caso, el recuento de leucocitos no sufrió variación significativa durante las primeras 12 semanas de vida, pero sí se observó un aumento significativo en las concentraciones de proteínas y glucosa en LCR para RN de menos de 28 semanas de edad postconcepcional (Rodríguez, 1990). Concluyen que estas observaciones son concordantes con la teoría de aumento de la permeabilidad de la BHE a ciertas macromoléculas en RNMBP (Seller, 1975; Adinolfi, 1976).

Martín-Ancel et al (Martín-Ancel, 2006), van más allá y estudian el recuento de leucocitos en 30 RN con riesgo de transmisión vertical de toxoplasmosis tras descartarse ésta por los métodos habituales. Así evitan el posible sesgo que supone el estudio en RN de “alto riesgo” tras descartar afección meníngea y no en RN realmente “sanos”. De los 30, 19 estaban asintomáticos y 11 con algún tipo de sintomatología. Obtuvieron un recuento de leucocitos para los RN asintomáticos de 1 células / mm<sup>3</sup> de media (rango de 0 a 5), y para los sintomáticos de 7 células / mm<sup>3</sup>, diferencia estadísticamente significativa (p<0,001). En la siguiente figura se muestran además los diagnósticos finales de los sujetos sintomáticos incluidos en el estudio (Figura 7).

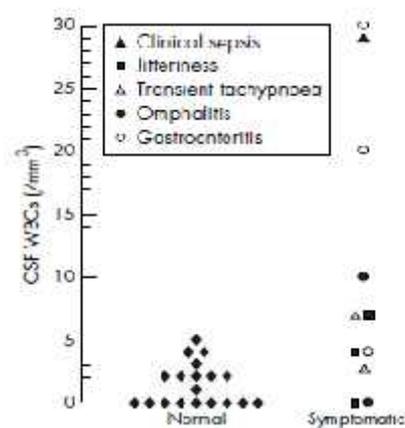


Figura 7: Recuento de leucocitos en RN “normales” y “sintomáticos” (Martín-Ancel, 2006)

Concluyen que el recuento de leucocitos en RN “normales” es similar al del adulto (<5 leucocitos / mm<sup>3</sup>), lo cual es concordante con un estricto control al paso de estas células al SNC por parte de la BHE. Una leve pleocitosis podría así encontrarse en RN sintomáticos sin infección del SNC, pero no ser un hallazgo dentro de la normalidad como se sospechaba hasta el momento. Esto podría ser particularmente relevante en el caso de RN asintomáticos con riesgo de infección, ya que el hallazgo de una leve pleocitosis podría ser el signo temprano de la participación del SNC en una infección

congénita. La mayor permeabilidad a proteínas de la BHE neonatal permitiría un paso más fácil de ciertas sustancias circulantes, tanto moléculas provenientes de microorganismos como mediadores proinflamatorios. Y esta sería la causa de la leve pleocitosis observada en RN sintomáticos sin implicación del SNC (Martín-Ancel, 2006).

Syrogianopoulos et al, en base al estudio previo de Bergström et al (Bergström, 1972) llevaron a cabo un estudio mediante el cual realizaron PL como evaluación inicial a 117 de los 206 lactantes menores de 3 meses ingresados por ITU confirmada bacteriológicamente. De los 117, en 15 se halló una pleocitosis estéril en LCR según se muestra a continuación (Tabla 8), definiendo pleocitosis como recuento leucocitario en LCR de hasta 35, 21 y 15 células / mm<sup>3</sup> en el primero, segundo y tercer mes de vida respectivamente.

Index	Month of Life		
	1st (n = 6)	2nd (n = 5)	3rd (n = 4)
Age (days)			
Median	9 (3.6)*	40 (6)	66 (7)
Range	4-16	35-55	61-75
Urina pathogen			
<i>Escherichia coli</i>	4	3	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1		
<i>Proteus vulgaris</i>		1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1	
CSF WBC/mm <sup>3</sup>			
Median	45 (12)	123 (102)	62 (156)
Range	35 <sup>†</sup> -1970	21 <sup>‡</sup> -300	47-360
CSF PMN (%)			
Median	60 (15)	23 (27)	54 (12)
Range	24-80	5-85	41-65
CSF ANC/mm <sup>3</sup>			
Median	28 (15)	9 (75)	32 (64)
Range	12-673	6-264	2 <sup>§</sup> -194
CSF protein (mg/dl)			
Median	60 (12)	46 (16)	51 (23)
Range	38-68	40-70	24-70
CSF plasmic (mg/dl)			
Median	56 (15)	57 (14)	58 (23)
Range	50-80	48-98	45-91

\* Numbers in parentheses, semiinterquartile range.

† One infant had 85 WBC/mm<sup>3</sup>, it was 18 days old and had ANC 38/mm<sup>3</sup>.

‡ One infant had 21 WBC/mm<sup>3</sup>, it was 40 days old and had ANC 9/mm<sup>3</sup>.

§ PMN, polymorphonuclear leukocytes.

Tabla 8: Edad, patógeno urinario y recuento de leucocitos en LCR en 15 lactantes con ITU y pleocitosis estéril en LCR concomitante (Syrogianopoulos, 2001)

Estos resultados implican que el 12,8% de los lactantes menores de 3 meses con ITU presentan una pleocitosis estéril concomitante. El germen urinario más frecuentemente asociado a pleocitosis estéril fue E. Coli, aunque algunos patógenos Gram positivos también pueden causarla. En ninguno de los 117 sujetos con ITU estudiados el cultivo de LCR resultó positivo (Syrogiannopoulos, 2001), lo cual es concordante con lo observado por Ginsburg and McCracken, que cultivaron el LCR de 88 lactantes con ITU y todos resultaron estériles (Ginsburg y McCracken, 1982). Basándose en estas observaciones, Syrogiannopoulos et al concluyen que en menores de 3 meses con ITU presentar una meningitis concomitante por el mismo germen es altamente improbable, incluso en los casos con bacteriemia añadida. Por ello, los esfuerzos terapéuticos deben ir encaminados únicamente a tratar la ITU, y no prolongar el tratamiento ni sustituirlo por fármacos de mayor penetración de la BHE con la intención de tratar la eventual inflamación meníngea. El mecanismo por el cual se produciría una leve inflamación meníngea en los casos de ITU neonatal no es bien conocido. La pleocitosis estéril podría aparecer también unida a otras infecciones a distancia, como neumonía u onfalitis. A este fenómeno se le ha denominado “meningitis simpática” (Olson, 1985). Aunque la infección bacteriana del espacio subaracnoideo, con escasa siembra bacteriana, no puede ser descartada, lo más probable es que la inflamación meníngea en pacientes con ITU se debida, al menos en algunos casos, a la endotoxina de bacterias Gram negativas, o a potentes moléculas proinflamatorias de patógenos urinarios Gram positivos. El lipopolisacárido de la endotoxina activa los genes que codifican el receptor “Toll-like” 4 y de la membrana CD14. Un reciente estudio muestra que las regiones periventriculares desprovistas de BHE expresan receptores Toll-like 4 y de membrana CD14. La activación por el lipopolisacárido

circulante posiblemente podría explicar la respuesta inmune innata del cerebro (Laflamme, 2001).

## **2. SUSTANCIA P Y RECEPTOR NK-1**

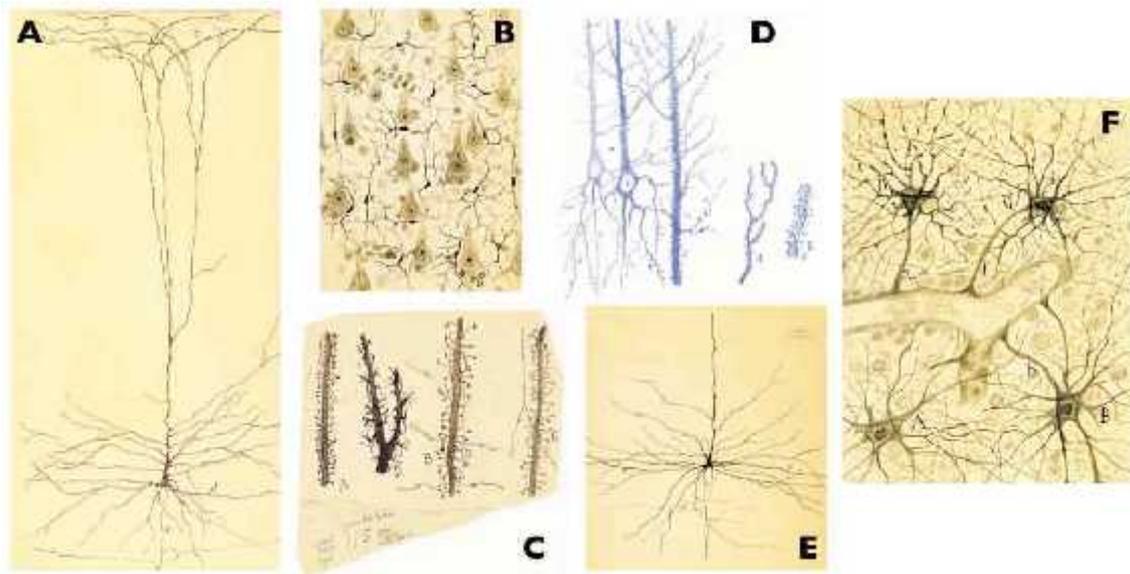
### **2.1 NEURONAS, SINAPISIS Y NEUROTRANSMISORES**

#### **Neuronas**

El sistema nervioso es único en cuanto a la enorme complejidad de procesos de pensamiento y acciones de control que es capaz de realizar. Cada minuto son literalmente millones los fragmentos de información que recibe procedentes de los distintos nervios y órganos sensitivos y a continuación integra todo este cúmulo para generar las respuestas que vaya a emitir el organismo. Consta de vías aferentes (nervios sensitivos) para recoger información en la periferia del organismo y transmitirla a los centros (médula, troncoencéfalo y encéfalo), que utilizan esta información para controlar las funciones mediante las vías eferentes (nervios motores y secretores) (Castro del Pozo, 1996).

Dentro de este excepcional sistema la neurona adquiere un papel primordial como unidad funcional básica del sistema nervioso central. Al hablar de la neurona merece mención especial el científico y Premio Nobel español D. Santiago Ramón y Cajal (1852-1934). Y es que los más de 30 artículos publicados por este científico entre 1888 y 1892, resumidos en su primera revisión sobre la estructura del sistema nervioso (Ramón y Cajal, 1892), sumados a sus ilustrativos dibujos (Figura 8) establecieron claramente la base de la teoría neuronal. Esta teoría establece los principios fundamentales de la organización y función del sistema nervioso al afirmar que las

neuronas son las unidades anatómicas, fisiológicas, genéticas y metabólicas del mismo (Jones, 1994; Shepherd, 1991). Del mismo modo, los trabajos de Cajal supusieron la base para la creación de la atmósfera científica necesaria originó el nacimiento de la neurociencia moderna (DeFelipe, 2002).



**Figura 8.** Dibujos realizados por Cajal de diferentes estructuras del SNC (A, células piramidales impregnadas con el método de Golgi; B, células microgliales de la corteza cerebral; C, diversos tipos de espinas dendríticas de células piramidales; D, espinas dendríticas con diferentes tinciones; E, células piramidales impregnadas con el método de Golgi; F, astrocitos de la sustancia blanca de la corteza cerebral (Imágenes modificadas de DeFelipe, 2005).

El SNC contiene más de cien mil millones de neuronas. Su estructura básica se detalla en las siguientes figuras (Figuras 9 y 10). Las señales de entrada llegan a ella a través de las sinapsis situadas fundamentalmente en las dendritas neuronales, pero también en el soma celular. Según los diversos tipos de neuronas, las conexiones sinápticas procedentes de las fibras aferentes pueden ser tan sólo unos cientos o llegar hasta 200.000. Por el contrario, la señal de salida viaja por el único axón que abandona la neurona. A continuación, este axón da origen a numerosas ramas independientes que se dirigen hacia otras zonas del sistema nervioso o de la periferia corporal. Un rasgo especial de la mayoría de las sinapsis consiste en que normalmente la señal sólo circula

en sentido anterógrado (desde el axón de una neurona precedente hasta las dendritas en la membrana celular de las neuronas ulteriores). Esto obliga a la señal a viajar en la dirección exigida para llevar a cabo las funciones nerviosas específicas.

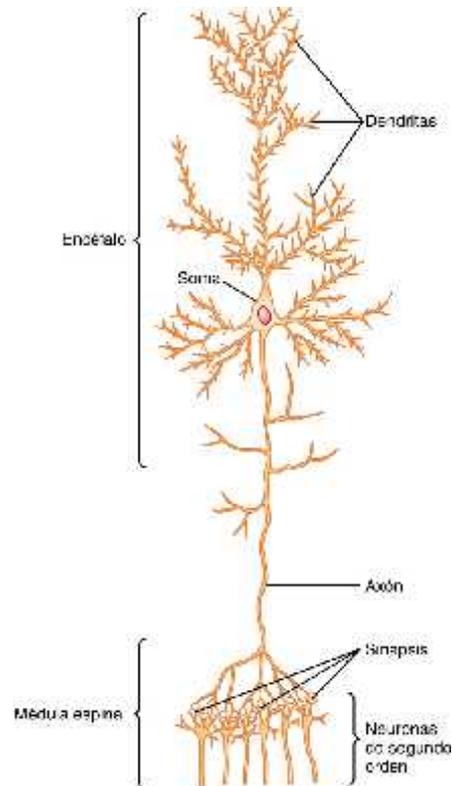


Figura 9: Estructura de una neurona grande perteneciente al encéfalo, con sus porciones funcionales más importantes. (Reproducido a partir de Guyton, 1987.)

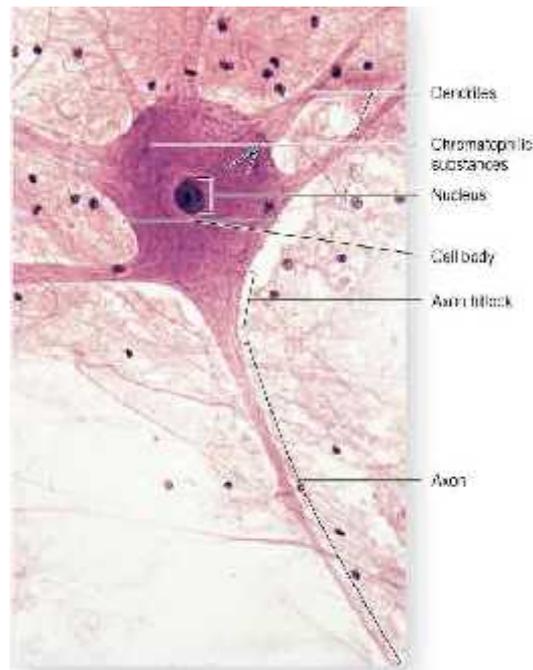


Figura 10: Fotografía al microscopio óptico de una gran motoneurona (x100, H.E.) (Imagen modificada de Mescher, 2010).

Una típica motoneurona anterior situada en el asta anterior de la médula espinal está compuesta por tres partes fundamentales: el soma, que es el cuerpo principal de la neurona; el único axón, que se extiende desde el soma hacia un nervio periférico para abandonar la médula espinal, y las dendritas, que constituyen una gran cantidad de prolongaciones ramificadas del soma con unas dimensiones hasta de 1 mm de recorrido hacia las zonas adyacentes en la médula. Sobre la superficie de las dendritas y del soma de la motoneurona se hallan entre 10.000 y 200.000 diminutos botones sinápticos llamados terminales presinápticos, estando aproximadamente del 80 al 95% en las dendritas y sólo del 5 al 20% en el soma. Estos terminales presinápticos ocupan el extremo final de las fibrillas nerviosas originadas en muchas otras neuronas. En gran parte son excitadores: es decir, segregan una sustancia transmisora que estimula a la neurona postsináptica; sin embargo, otras son inhibitoras, y segregan una sustancia transmisora que inhibe a la neurona postsináptica, aunque como veremos más adelante

el proceso puede ser mucho más complejo. Las neuronas pertenecientes a otras porciones de la médula y el encéfalo se distinguen de la motoneurona anterior en los siguientes aspectos: 1) las dimensiones del soma celular; 2) la longitud, el tamaño y el número de dendritas, que oscila desde casi 0 a muchos centímetros; 3) la longitud y el tamaño del axón, y 4) el número de terminales presinápticos, que puede oscilar desde tan sólo unos pocos hasta llegar a 200.000. Estas variaciones hacen que las neuronas situadas en las diversas partes del sistema nervioso reaccionen de forma dispar a las señales sinápticas llegadas y, por tanto, ejecuten muchas funciones diferentes.

## **Sinapsis**

La información recorre el SNC sobre todo bajo la forma de potenciales de acción nerviosos, llamados simplemente «impulsos nerviosos», a través de una sucesión de neuronas, una después de la otra. Sin embargo, además, cada impulso puede: 1) quedar bloqueado en su transmisión de una neurona a la siguiente; 2) convertirse en una cadena repetitiva a partir de un solo impulso, o 3) integrarse con los procedentes de otras células para originar patrones muy intrincados en las neuronas sucesivas. Todas estas actividades pueden clasificarse como funciones sinápticas de las neuronas.

Hay dos tipos principales de sinapsis: 1) la sinapsis química y 2) la sinapsis eléctrica. Las sinapsis eléctricas se caracterizan por la presencia de unos canales fluidos abiertos que conducen electricidad directamente desde una célula a la siguiente. La mayoría de ellos consta de pequeñas estructuras proteicas tubulares llamadas uniones en hendidura que permiten el movimiento libre de los iones desde el interior de una célula hasta el interior de la siguiente. Los potenciales de acción se transmiten a través de ellas y de otras uniones semejantes desde una fibra muscular lisa hasta la siguiente en el músculo liso visceral y desde un miocito cardíaco al siguiente en el músculo cardíaco.

Sin embargo, casi todas las sinapsis utilizadas para la transmisión de señales en el SNC del ser humano son sinapsis químicas. En ellas, la primera neurona segrega un producto químico denominado neurotransmisor a nivel de la terminación nerviosa, que a su vez actúa sobre las proteínas receptoras presentes en la membrana de la neurona siguiente para excitarla, inhibirla o modificar su sensibilidad de algún otro modo (Figura 11).

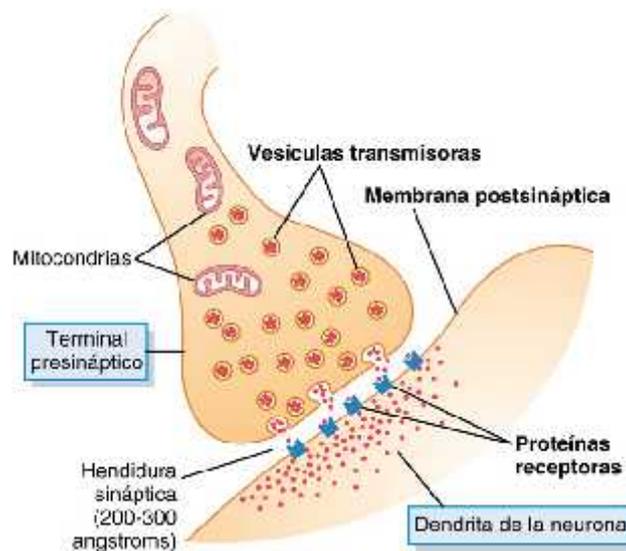


Figura 11: Anatomía fisiológica de la sinapsis (Guyton, 2011)

Las sinapsis químicas poseen una característica sumamente importante que las convierte en un elemento muy conveniente para transmitir la mayor parte de las señales en el sistema nervioso. Siempre conducen las señales en un solo sentido: es decir, desde la neurona que segrega la sustancia transmisora, denominada neurona presináptica, hasta la neurona sobre la que actúa el transmisor, llamada neurona postsináptica. Este es el principio de la conducción unidireccional de las sinapsis químicas y se aleja bastante de la conducción a través de las sinapsis eléctricas, que muchas veces transmiten señales en ambos sentidos. Este mecanismo de conducción unidireccional es de extraordinaria importancia. Da la oportunidad de enviar señales dirigidas hacia objetivos específicos. En efecto, es esta transmisión específica hacia regiones separadas y muy focalizadas, tanto en el sistema nervioso como en los terminales de los nervios periféricos, lo que le

permite llevar a cabo sus incontables funciones de sensibilidad, control motor, memoria y otras muchas.

Los estudios efectuados sobre los terminales presinápticos con el microscopio electrónico muestran que poseen variadas formas anatómicas, pero en su mayoría se parecen a pequeños botones redondos u ovalados y, por tanto, a veces se les llama botones terminales, botones, pies terminales o botones sinápticos. El terminal está separado del soma neuronal postsináptico por una hendidura sináptica cuya anchura suele medir de 200 a 300 angstroms. En él existen dos estructuras internas de importancia para la función excitadora o inhibitora de la sinapsis: las vesículas transmisoras y las mitocondrias. Las vesículas transmisoras contienen la sustancia transmisora que, cuando se libera a la hendidura sináptica, excita o inhibe la neurona postsináptica (excita si la membrana neuronal posee receptores excitadores e inhibe si tiene receptores inhibidores). Las mitocondrias aportan trifosfato de adenosina (ATP), que a su vez suministra energía para sintetizar más sustancia transmisora. Cuando se propaga un potencial de acción por un terminal presináptico, la despolarización de su membrana hace que una pequeña cantidad de vesículas viertan su contenido hacia la hendidura. Por su parte, el transmisor liberado provoca un cambio inmediato en las características de permeabilidad de la membrana neuronal postsináptica y esto origina la excitación o la inhibición de la célula, en función de las propiedades del receptor neuronal.

La membrana del terminal presináptico se llama membrana presináptica. Contiene una gran abundancia de canales de calcio dependientes de voltaje. Cuando un potencial de acción la despolariza, estos canales se abren y permiten la entrada en el terminal de un número importante de iones calcio. La cantidad de sustancia transmisora que sale a continuación hacia la hendidura sináptica desde el terminal es directamente

proporcional al total de iones calcio que penetran. No se conoce el mecanismo exacto por el que estos iones propician su liberación, pero se piensa que es el siguiente: Cuando los iones calcio llegan al terminal presináptico, parecen unirse a unas moléculas proteicas especiales situadas sobre la cara interna de la membrana presináptica, llamadas puntos de liberación. A su vez, este enlace suscita la apertura de los puntos de liberación a través de la membrana, y así permite que unas pocas vesículas transmisoras suelten su contenido hacia la hendidura después de cada potencial de acción. En el caso de las vesículas que almacenan el neurotransmisor acetilcolina, existen entre 2.000 y 10.000 moléculas de esta sustancia en cada una y en el terminal presináptico hay suficientes vesículas como para transmitir desde unos cuantos cientos hasta más de 10.000 potenciales de acción.

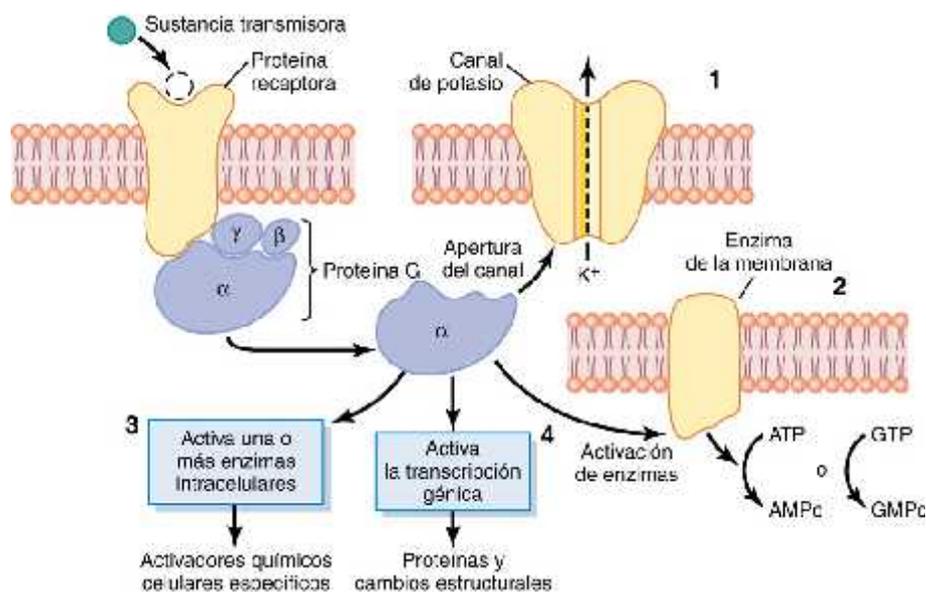
La membrana de la neurona postsináptica contiene una gran cantidad de proteínas receptoras. Las moléculas de estos receptores poseen dos elementos importantes: un componente de unión que sobresale fuera desde la membrana hacia la hendidura sináptica y donde se fija el neurotransmisor procedente del terminal presináptico, y un componente ionóforo que atraviesa toda la membrana postsináptica hasta el interior de la neurona postsináptica. Por su parte, este elemento se desdobra en dos clases: un canal iónico que permite el paso de determinados tipos de iones a través de la membrana o un activador de “segundos mensajeros” que en vez de un canal iónico es una molécula que protruye hacia el citoplasma celular y activa una sustancia o más en el seno de la neurona postsináptica. A su vez, estas sustancias actúan como segundos mensajeros para aumentar o disminuir determinadas funciones específicas de la célula.

Los canales iónicos de la membrana neuronal postsináptica suelen ser de dos tipos: 1) canales catiónicos, cuya clase más frecuente deja pasar iones sodio cuando se abren, pero a veces también cumplen esta función con el potasio o el calcio, y 2) canales

aniónicos, que permiten sobre todo el paso de los iones cloruro, pero también de minúsculas cantidades de otros aniones. Los canales catiónicos que transportan iones sodio están revestidos de cargas negativas. Esta situación atrae hacia ellos a los iones sodio dotados de carga positiva cuando el diámetro del canal aumenta hasta superar el tamaño del ion sodio hidratado. Pero esas mismas cargas negativas repelen los iones cloruro y otros aniones e impiden su paso. Con respecto a los canales aniónicos, cuando sus diámetros alcanzan las dimensiones suficientes, entran los iones cloruro y los atraviesan hasta el lado opuesto, mientras que los cationes de sodio, potasio y calcio quedan retenidos, básicamente porque sus iones hidratados son demasiado grandes para poder pasar. Más adelante estudiaremos que cuando se abren los canales catiónicos y dejan entrar iones sodio positivos, dicha carga eléctrica excitará a su vez a esta neurona. Por tanto, una sustancia transmisora capaz de abrir los canales catiónicos se denomina transmisor excitador. A la inversa, la apertura de los canales aniónicos permite la entrada de cargas eléctricas negativas, que inhiben a la neurona. Así pues, las sustancias transmisoras que abren estos canales se llaman transmisores inhibidores. Cuando una sustancia transmisora activa un canal iónico su apertura suele producirse en una fracción de milisegundo; si, en cambio, deja de estar presente, el canal se cierra con idéntica velocidad. La apertura y el cierre de los canales iónicos aportan un medio para el control muy rápido de las neuronas postsinápticas.

Muchas funciones del SNC, como, por ejemplo, los procesos de memoria, requieren la producción de unos cambios prolongados en las neuronas durante segundos y hasta meses después de la desaparición de la sustancia transmisora inicial. Los canales iónicos no son idóneos para originar una variación prolongada en las neuronas postsinápticas, porque se cierran en cuestión de milisegundos una vez desaparece la sustancia transmisora. Sin embargo, en muchos casos, se consigue una excitación o una

inhibición neuronal postsináptica a largo plazo al activar un sistema químico de segundo mensajero en el interior de esta misma célula, y a continuación será este elemento el que genere el efecto duradero. Existen diversos tipos de sistemas de segundo mensajero. Uno de los más frecuentes recurre a un grupo de proteínas llamadas proteínas G (Figura 12). Una proteína G está unida a la porción del receptor que sobresale hacia el interior de la célula. A su vez, la proteína G consta de tres elementos: un componente alfa ( $\alpha$ ), que es la porción activadora de la proteína G, y unos componentes beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) que están pegados al componente  $\alpha$  y también al interior de la membrana celular adyacente a la proteína receptora. Al activarse por un impulso nervioso, la porción  $\alpha$  de la proteína G se separa de las porciones  $\beta$  y  $\gamma$  y así queda libre para desplazarse por el citoplasma de la célula.



**Figura 12:** Sistema de segundo mensajero a través de proteína G. Una sustancia transmisora procedente de una neurona previa puede activar una segunda neurona primero por la liberación de una proteína G en el citoplasma de esta última. Se ofrecen los cuatro posibles efectos posteriores de la proteína G. 1, apertura de un canal iónico en la membrana de la segunda neurona; 2, activación de un sistema enzimático en la membrana de la neurona; 3, activación de un sistema enzimático intracelular; 4, inicio de la transcripción génica en la segunda neurona.

Dentro del citoplasma, el componente a desprendido ejecuta una función o más entre múltiples posibles, según las características específicas de cada tipo de neurona. En la Figura 12 se recogen cuatro de los cambios que pueden suceder. Son los siguientes:

**1.** Apertura de canales iónicos específicos a través de la membrana celular postsináptica.

En el extremo superior derecho de la figura se observa un canal de potasio que está abierto en respuesta a la proteína G; este canal suele permanecer así durante un tiempo prolongado, a diferencia del rápido cierre experimentado por los canales iónicos activados directamente que no recurren al sistema de segundo mensajero.

**2.** Activación del monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) o del monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) en la neurona. Recuerde que tanto el AMPC como el GMPc pueden activar una maquinaria metabólica muy específica en la neurona y, por tanto, poner en marcha cualquiera de las múltiples respuestas químicas, entre ellas los cambios prolongados en la propia estructura celular, que a su vez modifican la excitabilidad de la neurona a largo plazo.

**3.** Activación de una enzima intracelular o más. La proteína G puede activar directamente una enzima intracelular o más. A su vez, las enzimas pueden estimular cualquiera de las numerosas funciones químicas específicas en la célula.

**4.** Activación de la transcripción génica. Este es uno de los efectos más importantes ocasionados por la activación de los sistemas de segundo mensajero, debido a que la transcripción génica puede provocar la formación de nuevas proteínas en el seno de la neurona, modificando de ese modo su maquinaria metabólica o su estructura. En efecto, se sabe en general que aparecen cambios estructurales en las neuronas oportunamente activadas, sobre todo en los procesos de memoria a largo plazo.

Está claro que la activación de los sistemas de segundo mensajero dentro de la neurona, ya pertenezcan al tipo de la proteína G o a otras clases, resulta importantísima para variar las características de la respuesta a largo plazo en diferentes vías neuronales.

Algunos receptores postsinápticos, cuando se activan, provocan la excitación de la neurona postsináptica, y otros su inhibición. La importancia de poseer tanto el tipo inhibitorio de receptor como el excitador radica en que aporta una dimensión añadida a la función nerviosa, dado que permite tanto limitar su acción como excitarla. (Guyton & Hall, 2011).

## **Neurotransmisores**

Hasta hoy se han descubierto más de 50 sustancias neurotransmisoras importantes. Entre las mejor conocidas figuran las siguientes: acetilcolina, noradrenalina, adrenalina, histamina, ácido g-aminobutírico (GABA), glicina, serotonina y glutamato (Guyton & Hall, 2011). Para considerar una sustancia como neurotransmisora en sentido estricto, debe cumplir cuatro requisitos (Ceballos, 1997):

1. Debe sintetizarse en la neurona.
2. Debe estar presente en el terminal nervioso y liberarse en cantidades necesarias para ejercer su acción sobre la neurona postsináptica u órgano efector.
3. Su administración exógena, en concentraciones apropiadas, debe provocar el mismo efecto que el obtenido cuando la sustancia se libera de forma endógena.
4. Debe existir un mecanismo específico para eliminar la sustancia del espacio sináptico.

Existen diferentes clasificaciones de neurotransmisores. Una de las más aceptadas en la actualidad los divide en dos grandes grupos: los transmisores de acción rápida y molécula pequeña (NT clásicos) y neuropéptidos (NP) (Tabla 9).

<b>NEUROTRANSMISORES CLÁSICOS, DE MOLÉCULA PEQUEÑA O DE ACCIÓN RÁPIDA</b>	CLASE I	Acetilcolina
	CLASE II: AMINAS	Noradrenalina Adrenalina Dopamina Serotonina Histamina Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)
	CLASE III: AMINOÁCIDOS	Glicina Glutamato Aspartato
	CLASE IV	Óxido nítrico (NO)
<b>NEUROPEPTIDOS O NEUROTRANSMISORES DE ACCIÓN LENTA</b>	HORMONAS LIBERADORAS HIPOTALÁMICAS	Hormona liberadora de tirotrona Hormona liberadora de hormona luteinizante Somatostatina (factor inhibidor de la hormona del crecimiento)
	PÉPTIDOS HIPOFISARIOS	Hormona adrenocorticotropa (ACTH) $\beta$ -endorfina Hormona estimuladora de los melanocitos $\alpha$ Prolactina Hormona luteinizante Tirotrona Hormona de crecimiento Vasopresina Oxitocina
	PÉPTIDOS QUE ACTÚAN SOBRE EL INTESTINO Y EL ENCEFALO	Leucina-enkefalina Metionina-enkefalina Sustancia P Gastrina Colecistocinina Péptido intestinal vasoactivo (VIP) Factor de crecimiento nervioso Factor neurotrófico derivado del cerebro Neurotensina Insulina Glucagón
	PROCEDENTES DE OTROS TEJIDOS	Angiotensina II Eradicina Cauxosina Péptidos del sueño Calcitonina

**Tabla 9:** Clasificación de los NT según el tipo de molécula y mecanismo de acción (Modificada de Guyton & Hall, 2011).

Los transmisores de acción rápida y molécula pequeña son los que producen las respuestas más inmediatas del sistema nervioso (p.e. la transmisión de las señales sensitivas hacia el encéfalo y de las señales motoras hacia los músculos). En cambio los NP suelen provocar acciones más prolongadas, como son los cambios a largo plazo en el número de receptores neuronales, la apertura o el cierre duraderos de ciertos canales iónicos e incluso las modificaciones persistentes en la cantidad de sinapsis o su tamaño.

En la mayoría de los casos, los tipos de transmisores de molécula pequeña se sintetizan en el citoplasma del terminal presináptico y las numerosas vesículas

transmisoras presentes a este nivel los absorben por transporte activo. A continuación, cada vez que llega un potencial de acción al terminal presináptico, las vesículas liberan su transmisor a la hendidura sináptica en pequeños grupos. Esto suele suceder en cuestión de milisegundos o menos según el mecanismo descrito antes. La siguiente acción de un transmisor de este tipo sobre los receptores de la membrana en la neurona postsináptica normalmente también ocurre en un plazo de otros milisegundos o menos. Lo más frecuente es que el efecto consista en incrementar o disminuir la conductancia que presentan los canales iónicos; un ejemplo sería aumentar la conductancia al sodio, lo que causa una excitación, o la del potasio o el cloruro, lo que supone una inhibición.

Las vesículas que se almacenan y liberan transmisores de molécula pequeña se reciclan continuamente y se utilizan una y otra vez. Una vez que se fusionan con la membrana sináptica y se abren para verter la sustancia transmisora, la membrana de la vesícula simplemente forma parte al principio de la membrana sináptica. Sin embargo, pasados unos segundos a minutos, la porción correspondiente a la vesícula se invagina hacia el interior del terminal presináptico y se desprende para configurar una nueva vesícula. Y esta membrana vesicular aún contiene las proteínas enzimáticas adecuadas o las proteínas de transporte necesarias para sintetizar o concentrar la sustancia transmisora una vez más en su interior. La acetilcolina es un típico transmisor de molécula pequeña que obedece a los principios de síntesis y liberación antes expuestos. Esta sustancia transmisora se sintetiza en el terminal presináptico a partir de acetil coenzima A y colina en presencia de la enzima acetiltransferasa de colina. A continuación, se transporta a sus vesículas específicas. Cuando más tarde se produce su salida desde ellas a la hendidura sináptica durante la transmisión de la señal nerviosa en la sinapsis, se degrada de nuevo con rapidez en acetato y colina por acción de la enzima colinesterasa, que está presente en el retículo formado por proteoglicano que rellena el

espacio de la hendidura sináptica. Y después, una vez más, las vesículas se reciclan en el interior del terminal presináptico; la colina sufre un transporte activo de vuelta hacia el terminal para repetir su empleo en la síntesis de nueva acetilcolina.

Los más importantes transmisores de molécula pequeña son los siguientes:

La *acetilcolina* se segrega por las neuronas situadas en muchas regiones del sistema nervioso, pero específicamente en: 1) los terminales de las células piramidales grandes de la corteza motora; 2) diversos tipos diferentes de neuronas pertenecientes a los ganglios basales; 3) las motoneuronas que inervan los músculos esqueléticos; 4) las neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo; 5) las neuronas posganglionares del sistema nervioso parasimpático, y 6) parte de las neuronas posganglionares del sistema nervioso simpático. En la mayoría de los casos, la acetilcolina posee un efecto excitador; sin embargo, se sabe que ejerce acciones inhibitorias en algunas terminaciones nerviosas parasimpáticas periféricas, como la inhibición del corazón a cargo de los nervios vagos. La *noradrenalina* se segrega en los terminales de muchas neuronas cuyos somas están situados en el tronco del encéfalo y el hipotálamo. En concreto, las que están localizadas en el locus ceruleus de la protuberancia envían fibras nerviosas a amplias regiones del encéfalo que sirven para controlar la actividad global y el estado mental, como por ejemplo aumentar el nivel de vigilia. En la mayoría de estas zonas, la noradrenalina probablemente activa receptores excitadores, pero en unas cuantas, en cambio, estimula los inhibidores. También se segrega en la mayor parte de las neuronas posganglionares del sistema nervioso simpático, donde excita algunos órganos pero inhibe otros. La *dopamina* se segrega en las neuronas originadas en la sustancia negra. Su terminación se produce básicamente en la región estriada de los ganglios basales. El efecto que ejerce suele ser una inhibición. La *glicina* se segrega sobre todo en las sinapsis de la médula espinal. Se cree

que siempre actúa como un transmisor inhibitor. El *GABA* (*ácido g-aminobutírico*) se segrega en los terminales nerviosos de la médula espinal, el cerebelo, los ganglios basales y muchas áreas de la corteza. Se piensa que siempre causa una inhibición. El *glutamato* se segrega en los terminales presinápticos de muchas de las vías sensitivas que penetran en el sistema nervioso central, lo mismo que en muchas áreas de la corteza cerebral. Probablemente siempre causa excitación. La *serotonina* se segrega en los núcleos originados en el rafe medio del tronco del encéfalo que proyectan hacia numerosas regiones del cerebro y de la médula espinal, especialmente a las astas dorsales de la médula y al hipotálamo. Actúa en la médula como un inhibidor de las vías del dolor, y se piensa que la acción inhibitora sobre las regiones superiores del sistema nervioso ayuda a controlar el estado de ánimo de una persona, tal vez incluso provocando sueño. El *óxido nítrico* se segrega especialmente en los terminales nerviosos de las regiones encefálicas responsables de la conducta a largo plazo y de la memoria. Por tanto, este sistema transmisor podría esclarecer en el futuro algunas de las funciones correspondientes a estos dos aspectos que hasta ahora han desafiado toda explicación. El óxido nítrico difiere de otros transmisores de molécula pequeña por su mecanismo de producción en el terminal presináptico y por sus acciones sobre la neurona postsináptica. No está formado con antelación y almacenado en vesículas dentro del terminal presináptico como los demás transmisores. En su lugar, se sintetiza casi al instante según las necesidades, y a continuación difunde fuera de los terminales presinápticos durante un período de segundos en vez de ser liberado en paquetes vesiculares, y después hacia las neuronas postsinápticas cercanas. En ellas, no suele alterar mucho el potencial de membrana, sino que modifica las funciones metabólicas intracelulares que cambian la excitabilidad neuronal durante segundos, minutos o tal vez incluso más tiempo (Guyton & Hall, 2011).

## 2.2 NEUROPEPTIDOS

Los NP constituyen un grupo de neurotransmisores ampliamente presentes en todo el reino animal, habiendo sido descritos incluso en organismos tan primitivos como la hydra, metazoo con un sistema nervioso muy rudimentario (Grimmelikhuijzen, Leviev y Carstensen, 1996). Así mismo, existen múltiples NP (Schoofs, 1997) y sus receptores (Vanden Broeck, 1998) en insectos. Las familias de NP tienen su origen en diferentes genes primitivos de varios millones de años de antigüedad que, a través de procesos como la duplicación genética y mutaciones puntuales, han evolucionado hasta formar el grupo conocido en la actualidad (Hoyle, 1998). Las investigaciones sobre los NP se vienen llevando a cabo de manera más intensa y específica desde hace 40-50 años. El descubrimiento por parte de Guillemin, Vale et al, así como de Schally, Arimura et al, de que la mayoría de hormonas inhibitoras y estimuladoras de hipotálamicas estaban constituidas químicamente por pequeños péptidos supuso el primer gran impulso en el interés para la investigación en el campo de los NP. Y más aún la sorprendente observación posterior a través de estudios de radioinmunoensayo e inmunohistoquímica de que algunos de esos péptidos no estaban confinados únicamente a la eminencia media/infundíbulo del hipotálamo, que es el lugar de almacenamiento y liberación esperado para estos factores/hormonas, y el área cerebral donde habían sido aislados. Así, la hormona liberadora de tirotrópina, somatostatina y hormona liberadora de corticotropina ahora sabemos que tienen una amplia distribución en el cerebro con distintas acciones. Posteriormente se llevaron a cabo casi concomitantemente trabajos sobre la SP por Leeman et al, sobre péptidos opioides por Hughes, Kosterlitz et al, y la demostración por parte de Vanderhaegen et al de que la colecistoquinina estaba también presente en el cerebro, haciendo todos estos estudios aumentar considerablemente el interés en la comunidad científica por los NP (Hokfelt, 2000). La familia de NP

estudiada más en profundidad la constituyen los péptidos oxitocina y vasopresina, que fueron realmente los primeros NP descubiertos y químicamente identificados (Du Vigneaud, 1953). Ambos poseen gran similitud estructural, pero son producidos en diferentes neuronas, tienen distintas acciones fisiológicas y provienen de dos líneas celulares: la línea isotocina-mesotocina-oxitocina, asociada con funciones reproductivas, y la línea vasotocina-vasopresina, implicada en el balance hidroelectrolítico (Acher, 1995; Hoyle, 1998).

### **Biosíntesis de los neuropéptidos**

Los NP conforman un grupo de NP totalmente diferente a los neurotransmisores clásicos, ya que se sintetizan de una forma y desempeñan acciones diferentes. A partir de trabajos pioneros sobre la insulina y lipotropina (Lazure, 1983) se formuló la hipótesis de que estos péptidos derivaban de un largo precursor que se escindía enzimáticamente. Mediante estudios de secuenciación de aminoácidos, Schwartz y Costa (1986) descubrieron las denominadas poliproteínas, llamadas así porque sirven de precursor de más de un péptido biológicamente activo. Estas proteínas, también denominados prohormonas, serán fraccionados después por enzimas específicas en fragmentos más pequeños, formando de esta manera los NP que serán liberados posteriormente (Seidah y Chretien, 1999). Las poliproteínas pueden dar lugar a una amplia variedad de NP necesaria para mediar en distintas funciones fisiológicas, ya que cada una de ellas puede contener varias copias del mismo o de diferentes péptidos bioactivos, con funciones biológicas relacionadas o totalmente diferentes. Incluso varios NP de una familia específica pueden derivar de precursores diferentes. Sin embargo, éste no es el único mecanismo por el que se consigue diversidad en la producción de NP. Todos los pasos que median en la expresión de un gen codificante para una

poliproteína pueden estar implicados en esta diversidad, incluso la expresión de un determinado gen de una poliproteína puede estar regulada de forma diferente en distintos tejidos. De esta manera, el gen codificante de una poliproteína puede dar lugar a distintos NP en diferentes neuronas dependiendo de los diversos modos de procesamiento de dicho precursor poliproteínico. A modo de ejemplo, para la síntesis de la preproopiomelanocortina existe un mismo ARNm en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis, en el hipotálamo y otras regiones del encéfalo, en la placenta, en el intestino, en los ovarios o los testículos; sin embargo los péptidos que se producen y liberan en cada uno de los tejidos citados serán diferentes (Benjannet, 1980; Tremblay, 1988; Zakarian y Smyth, 1979).

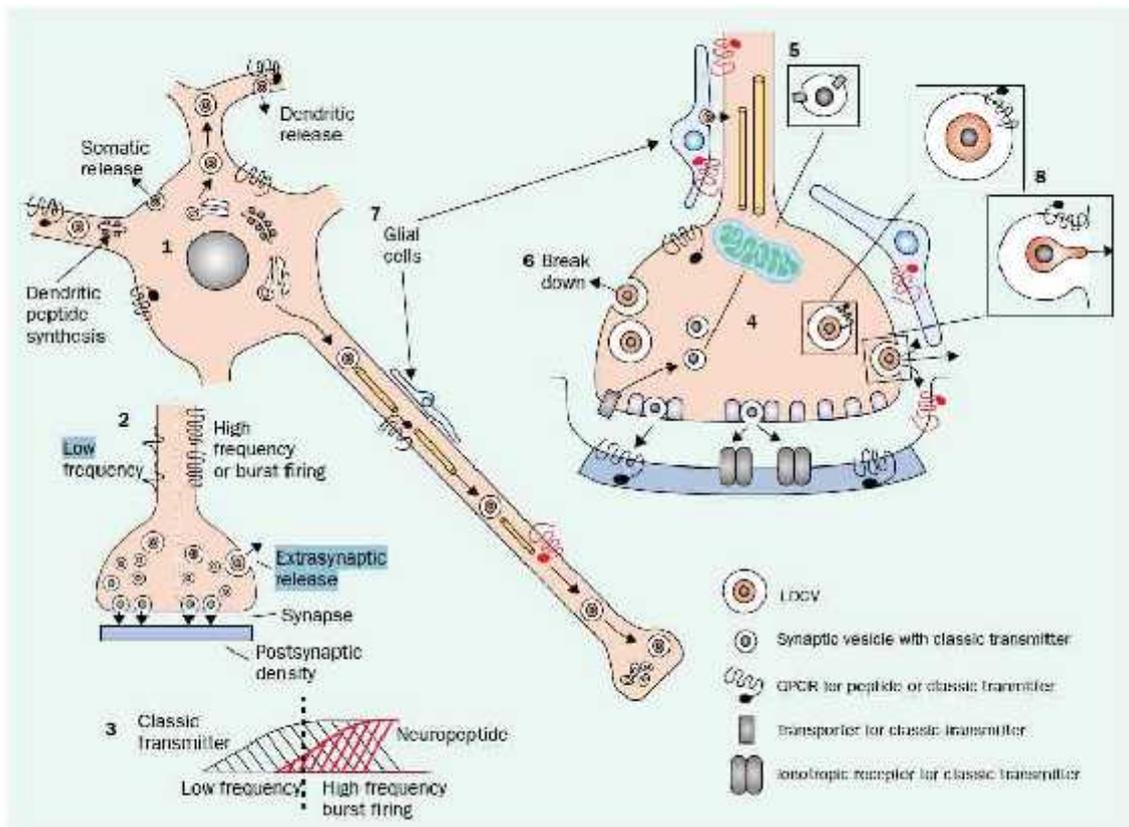
A diferencia de los neurotransmisores clásicos, que también pueden ser sintetizados localmente en el citoplasma de los terminales presinápticos, los NP sólo se producen de novo en los ribosomas del soma neural, a partir de los prepropéptidos ya comentados, que incluyen una secuencia señal hidrofóbica (de 15-30 aminoácidos) en el extremo amino terminal (Strand, 1999). Esta secuencia facilita su translocación a través de la membrana del retículo endoplasmático del soma y posteriormente el aparato de Golgi, donde se producen dos cambios. En primer lugar, la proteína precursora del NP sufre una escisión enzimática en fragmentos más pequeños, algunos de los cuales son el propio NP o un precursor mayor. En segundo lugar, el aparato de Golgi empaqueta el NP o precursor en minúsculas vesículas transmisoras que se liberan hacia el citoplasma, para ser transportadas de forma centrífuga por el axón hacia el extremo de las fibras nerviosas, impulsadas por la corriente axónica del citoplasma, viajando a la velocidad de tan sólo unos pocos centímetros al día (Figura 13). En estas vesículas densas o gránulos secretores se almacenan los propéptidos junto a sus enzimas procesadoras o

convertidas, responsables de recortar los propeptidos para dar lugar a sus formas bioactivas (Hokfelt, 2000).

Los NP pueden estar presentes en las neuronas al menos de tres maneras diferentes (Tohyama, 1992):

- A altas concentraciones en condiciones normales, lo que indica que están funcionalmente disponibles para su liberación en cualquier momento.
- A concentraciones bajas o indetectables en condiciones normales: en estos casos la síntesis será estimulada sólo en ciertas condiciones, por lo que precisan de un estímulo específico para adquirir relevancia funcional.
- Con alta expresión en etapas tempranas del desarrollo, generalmente prenatal, y posterior disminución de la misma en la etapa postnatal.

Parece que existe una relación entre el segundo y el tercer modo de expresión, ya que muchos de los NP que aparecen durante la ontogénesis pueden ser “reactivados” posteriormente en la vida adulta por estímulos específicos. También hay que señalar que un mismo NP puede expresarse de cualquiera de estas tres formas dependiendo del tipo de neurona y del uso que cada neurona le dé a cada NP en cada situación particular.



**Figura 13:** Representación esquemática de la síntesis neuronal de NP, explicación en el texto (Hokfelt, 2003).

Aunque los NP están presentes por todo el sistema nervioso (cerebro, médula espinal, tracto gastrointestinal, ganglios autonómicos y sensoriales...), en cada región siguen un patrón de distribución propio y diferente. También hay evidencias de que los NP, a pesar de su nombre, se expresan en las células gliales, aunque la función que ejercen en éstas células no neuronales continúa siendo controvertida (Hokfelt, 2000). La mayoría de los estudios se centran en la demostración en cultivos celulares, como por ejemplo la demostración de RNAm de pre-proencefalina, RNAm de preprosomatostatina y el NP encefalina en astrocitos (Klein y Fricker, 1992; Melner, 1990; Schwartz y Simantov, 1988; Shinoda, 1992, 1989; Spruce, 1990; Steine-Martin, 1991; Vilijn, 1988). El péptido natriurético auricular ha sido encontrado en astrocitos de cerebro canino in situ (McKenzie, 1992). Del mismo modo, se ha hallado galanina en células gliales in vivo de cerebro de rata (Zhang, 1992).

## **Plasticidad de los NP**

Otra característica de la expresión de los NP es su plasticidad, ya que su nivel de expresión puede variar considerablemente en diferentes condiciones, incluyendo variaciones endógenas diurnas y tras manipulaciones experimentales. Tras su liberación, la reposición de los NP se produce casi exclusivamente a través de nueva síntesis ribosomal, y es que tras la activación neuronal y correspondiente liberación peptídica se produce una sobreexpresión de los niveles de ARNm con esta finalidad (Schalling, 1987). Esta es la razón por la que, a diferencia de lo que ocurre con los neurotransmisores clásicos, tras la liberación de los NP se produce una considerable demora hasta que se restablecen los niveles previos en las terminaciones nerviosas, debido además al lento transporte de los NP desde el soma hasta las terminaciones nerviosas vía axonal (una excepción a esta norma podría ser el neurotransmisor CCK, para el que parece haberse descrito un mecanismo de resíntesis más rápido (Migaud, 1995)). Este mecanismo de síntesis, que puede parecer menos eficaz, se refleja en la dinámica de las sinapsis peptidérgicas, en la que aunque los péptidos se liberan de forma intermitente compensan este fenómeno al presentar una acción más duradera. Así, por ejemplo, neurotransmisores clásicos como las catecolaminas pueden ser localmente sintetizados en las terminaciones nerviosas y repuestos mediante eficientes mecanismos, siendo la tasa o frecuencia de síntesis regulada por fosforilación enzimática. De este modo, los niveles de neurotransmisores clásicos se mantienen constantes bajo diversas condiciones. Para el estudio de los mecanismos de regulación de la síntesis de los neurotransmisores peptidérgicos se han empleado técnicas de hibridación in situ (Young, 1990), analizando los niveles de RNAm del péptido en el soma neuronal bajo varias condiciones experimentales. Los más estudiados han sido los de las neuronas sensoriales primarias y las neuronas del núcleo estriado de rata, aunque

regulaciones similares a las de estas localizaciones se dan en otros muchos sistemas. Las neuronas sensoriales primarias contienen grandes cantidades de NP y constituyen un buen modelo para el análisis de los mecanismos de regulación peptidérgicos. Algunos de estos péptidos, como por ejemplo la SP y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, se encuentran presentes en muchas neuronas de los ganglios de la raíz dorsal ganglionar bajo condiciones normales. Ambos facilitan la neurotransmisión en el asta dorsal (además de presentar efectos periféricos, como la vasodilatación), y se ha observado que sus niveles descienden tras axotomía (Nielsch, 1987; Noguchi, 1990). Otros NP como el VIP (péptido intestinal vasoactivo), PHI (péptido histidina-isoleucina), galanina y NPY (neuropéptido tirosina) normalmente se expresan en niveles bajos, pero aumentan enormemente tras manipulación experimental, especialmente axotomía (Hokfelt, 1987; Shebab y Atkinson, 1986; Wakisaka, 1991). Además, los receptores peptidérgicos son también regulados en la raíz dorsal ganglionar tras axotomía, incluyendo los receptores CCK<sub>B</sub> (Zhang, 1993), NPY Y1 (Zhang, 1994) y NPY Y2 (Zhang, 1997). Tales hallazgos sugieren que cambios en la sensibilidad a los NP podría ayudar a las neuronas sensoriales primarias en su adaptación en situaciones de trauma. En conjunto, las neuronas sensoriales primarias varían su fenotipo tanto en relación a los mensajeros como a los receptores y función tras lesión nerviosa periférica, y las neuronas de la raíz dorsal ganglionar se adaptan a esta nueva situación mediante la supresión de transmisores excitatorios y aumento de los inhibitorios, promoviendo mecanismos de regeneración y supervivencia. Todo esto es concordante con la visión general existente de la respuesta de las neuronas a la lesión, principalmente basada en estudios sobre motoneuronas (Kreutzberg, 1982), enfatizando que la maquinaria de síntesis de la neurona es reprogramada desde la síntesis de transmisores hasta la producción de moléculas para la supervivencia y recuperación. Existe evidencia de que

cambios similares ocurren cuando las neuronas cerebrales son dañadas o sufren algún tipo de degeneración. Así, recientes estudios sobre modelos de Alzheimer en ratones sugieren que la galanina y otros péptidos sufren una regulación al alza de una manera específica en hipocampo y corteza ventral en ratones ancianos transgénicos con alta densidad de placas (Díez, 1999). Otro claro ejemplo de cambios en la expresión de NP en el cerebro relacionados con la enfermedad ha sido aportados en estudios sobre varios modelos de animales epilépticos, donde el NPY y otros NP se ven incrementados radicalmente, especialmente en el hipocampo (Gall, 1990; Schwarzer, 1996).

Los ganglios basales y estructuras asociadas están relacionados con varias patologías severas del SNC, como la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington. Casi todo el interés se ha centrado en la dopamina y sus funciones, pero los NP también han de ser considerados por su involucración en estas patologías (Gerfen y Wilson, 1996; Graybiel, 1990). Así, la mayoría de las neuronas dopaminérgicas contienen NP, en particular CCK, y las prolongaciones neuronales expresan NP en cantidades elevadas o escasas. De estos últimos, una población contiene SP y dinorfina, y son proyectadas hasta la zona reticulada de la sustancia nigra, mientras que el otro tipo expresan encefalina, y proyectan principalmente al globus pallidus (Gerfen y Wilson, 1996; Graybiel, 1990). Técnicas de doble tinción han demostrado que muchas de estas neuronas peptidérgicas utilizan GABA como su principal neurotransmisor (Penny, 1986). Encefalina, SP y dinorfina son regulados por la señal dopaminérgica procedente de la sustancia nigra, como han evidenciado varios experimentos. De este modo, una atenuación en la señal dopaminérgica en el estriado, por ejemplo mediante la lesión de la vía nigroestriatal con 6-hidroxidopamina o mediante el tratamiento con inhibidores de los receptores dopaminérgicos, produce un incremento en la expresión de encefalina y una disminución de dinorfina y SP, mientras que el tratamiento con agonistas

dopaminérgicos aumenta los niveles de dinorfina y SP pero no así de encefalina (Gerfen y Wilson, 1996).

En el estriado, la dopamina también regula al NP neurotensina, presentando ambos interesantes interacciones clínicas (Kitabgi, 1989; Nemeroff, 1986). Así, las drogas que atenúan la transmisión dopaminérgica, como el haloperidol, 6-hidroxi-dopamina y reserpina, aumentan los niveles de neurotensina en el estriado de la rata vía receptores D2 (Deutch y Zahm, 1992). Además, la estimulación de los receptores dopaminérgicos, pero en este caso los receptores D1 (con metanfetamina), aumenta igualmente los niveles de neurotensina (Letter, 1987; Wachi, 1987). La neurotensina regulada a través del receptor D1 se encuentra en las neuronas nigroestriatales (Castel, 1993), mientras que la neurotensina regulada a través del receptor D2 aparece en las neuronas que proyectan hacia el globus pallidus. Esto entra en consonancia con lo clásicamente conocido de que las neuronas nigroestriatales se rigen principalmente por receptores D1 y las del globus pallidus contienen receptores D2 (Gerfen y Wilson, 1996).

### **Sinapsis peptidérgicas**

En las sinapsis peptidérgicas, al igual que en las del resto de neurotransmisores, se produce una despolarización del terminal presináptico seguida de una apertura de canales de  $Ca^{++}$  voltajedependientes que permite la entrada de este catión al interior de la neurona. Estos iones  $Ca^{++}$  promueven que las vesículas que contienen los NP viertan su contenido al espacio sináptico tras fusionarse con la membrana plasmática del terminal presináptico. Sin embargo la liberación de los NP se desencadena por elevaciones de concentración de  $Ca^{++}$  citoplasmático mucho menores que la de los neurotransmisores clásicos (Verhage, 1991). Desde 1990 existe evidencia morfológica

de que los NP pueden liberarse extrasinápticamente (Figura 13) (Thureson-Klein y Klein, 1990).

En el terminal postsináptico, al ser insolubles en la membrana plasmática, los NP deben ejercer sus efectos interactuando con los receptores de la superficie celular (Dobrescu, 1998). Esta interacción normalmente da lugar a un cambio en la estructura tridimensional del receptor, fenómeno que origina una cascada de eventos en la célula postsináptica que se traducirá en la respuesta celular.

La eliminación de los neurotransmisores tras su liberación a la hendidura sináptica resulta crítica para la eficacia de la transmisión nerviosa. En el caso de los NP, esta eliminación es mucho más lenta que en el de los neurotransmisores de pequeño tamaño molecular, ya que a diferencia de estos últimos, los NP no pueden recaptarse por el terminal presináptico para su reutilización y sólo pueden eliminarse mediante difusión y proteólisis por peptidasas extracelulares (Akopian, 1991). Además se ha comprobado que el proceso de eliminación de los NP depende de la función que desempeñan: los que actúan como neurotransmisores tienen una vida corta mientras que los neuromoduladores tendrán un retraso en los mecanismos de degradación para permitirles cumplir su función (Checler, 1993). Debido al laborioso método de síntesis descrito, los NP se encuentran en el SNC a concentraciones entre 1000 y 100.000 veces menores que las de los neurotransmisores de molécula pequeña (los NP cerebrales se encuentran en concentraciones del orden de  $10^{-12}$ - $10^{-15}$  mol /mg de proteína, mientras que la de acetilcolina o norepinefrina, entre  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  mol/ mg) y por tanto, se liberan en una cantidad mucho menor que los neurotransmisores clásicos. Esta diferencia de concentración se compensa por varias circunstancias. En primer lugar, los NP poseen una afinidad por sus receptores diez mil veces mayor que la de los neurotransmisores clásicos, lo cual les confiere una potencia mucho mayor. Además, actúan a través de

vías intracelulares que pueden proporcionar una amplificación significativa. Por último, al ser más lentos los mecanismos por los que los NP se eliminan de la hendidura sináptica, éstos permanecen accesibles a sus receptores durante más tiempo (Fuxe, 1994). Como ya se ha comentado, otra característica importante de los NP es que a menudo ocasionan acciones mucho más duraderas, como son el cierre prolongado de los canales de calcio, cambios persistentes en la maquinaria metabólica de las células, activación o desactivación de genes específicos dentro del núcleo celular y alteraciones a largo plazo de la cantidad de receptores excitadores o inhibidores. Algunos de estos efectos duran días, pero otros quizás meses o años.

Un avance importante en el campo de los NP fue descubrir que éstos casi siempre coexisten y se liberan de forma conjunta con uno o más neurotransmisores clásicos (Hokfelt, 1980; Hokfelt, 1980; Karhunen, 2001; Lundberg, 1996). Este fenómeno contradice e invalida la hipótesis enunciada por Henry Dale en 1935 (posteriormente conocido como Principio de Dale), según la cual una determinada neurona libera en todas sus terminaciones un único tipo de neurotransmisor, que define el tipo de neurona (Dale, 1935). De hecho en las neuronas adultas es habitual la coexistencia de un neurotransmisor de molécula pequeña con uno o más de naturaleza peptídica. En este sentido, los NP ejercen un papel de neuromodulador, ya que tienen la capacidad de modificar la acción de los otros neurotransmisores (Kandel, 1998). De esta manera surge el concepto morfológico de coexistencia y el funcional de cotransmisión, que implican la regulación de un neurotransmisor no peptídico o de molécula pequeña por otro de naturaleza neuropeptídica. Esta acción se ve favorecida por la lenta degradación y amplia difusión peptídica, lo cual permite controlar grupos neuronales incluso lejanos a su liberación (Björklund, 1992; Ceballos, 1997). Esta neuromodulación también la ejercen regulando la liberación de distintos

neurotransmisores (Maneuf, 1994; O'Connor, 1992), ya que en las terminaciones neuronales presinápticas existen receptores de NP (Ceballos, 1997). Este fenómeno de cotransmisión permitió aclarar fenómenos inexplicables hasta entonces, como era el hecho de que la interacción de un neurotransmisor no peptídico con su receptor en presencia de un NP ejerza una acción diferente o independiente a la que realiza dicho neurotransmisor de manera aislada sobre el mismo receptor; y es que la acción del NP es la de modular, positiva o negativamente, la acción del no peptídico, interfiriendo en la interacción de éste último sobre su receptor (Hokfelt, 1980; Lundberg, 1985). Los neurotransmisores clásicos también pueden coexistir entre ellos en una misma neurona, por ejemplo, GABA, glutamato, glicina y ATP (Hokfelt, 2000). Se ha visto que glicina y GABA coexisten en las células de Golgi cerebelosas (Ottersen, 1988) y en la médula espinal (Todd y Sullivan, 1990), y que realmente ambos pueden ser liberados conjuntamente en la médula espinal (Jonas, 1998). En la actualidad se conocen numerosos ejemplos de cotransmisión neuronal en diferentes localizaciones. Sabemos que en el asta dorsal de la médula espinal la SP coexiste tanto con neurotransmisores clásicos (catecolaminas) (Ljungdahl, 1978) como con otros NP (VIP, galanina, neurotensina, CCK) (Radhakrishnan y Henry, 1995). Otro ejemplo de cotransmisión de un NP con un neurotransmisor de molécula pequeña ha sido descrito en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, donde coexisten SP y glutamato, comprobándose que cuando se antagonizan ambos neurotransmisores la excitación se reduce enérgicamente, lo que sugiere la existencia de una interacción sinérgica que induce sensibilidad central (De Biasi y Rustioni, 1988). Aunque se ha intentado establecer una relación en la coexistencia y colocalización de los diferentes tipos de neurotransmisores, parece que no hay ninguna regla general o patrón de combinación. La coexistencia parece ser un fenómeno tan generalizado que la cuestión podría ser si realmente existe algún NP que

no coexista con un neurotransmisor clásico. Una posible excepción serían las neuronas magnocelulares hipotalámicas, que contienen los neuropéptidos oxitocina y vasopresina como sus principales neurotransmisores (Brownstein y Mezey, 1986). En las neuronas parvocelulares hipotalámicas, relacionadas con el control de la hipófisis anterior, en las que los NP son presumiblemente los transmisores más importantes, excepto por algunas neuronas tuberoinfundibulares que parecen contener dopamina, factor inhibidor de la prolactina, como transmisor principal (Hokfelt y Fuxe, 1972). Algunas neuronas de CRH de los núcleos paraventriculares expresan GAD (ácido glutámico-decarboxilasa) y sintetizan GABA (Meister y Hokfelt, 1988). De nuevo el CRH es probablemente el neurotransmisor principal, y el GABA posiblemente un modulador de su liberación. En prácticamente ninguna del resto de las neuronas, que se sepa, es el NP el neurotransmisor principal. Actualmente la máxima atención se centra en el estudio de la coexistencia de NP con aminas biógenas y acetilcolina. Por ejemplo, en la rata las neuronas 5-HT más caudales del asta anterior medular expresan también TRH y SP, mientras que las del asta posterior carecen de estos NP (Hokfelt, 2000).

Los NP también pueden actuar como neurohormonas, es decir, actuar sobre poblaciones celulares (incluyendo neuronas) situadas a distancia tras ser liberados directamente a la sangre o al líquido extracelular (Strand, 1999). Y es que, en general, las neuronas pueden liberar un “cóctel” de moléculas mensajeras con un amplio espectro de acciones biológicas y diferente información temporal (señales lentas, intermedias y rápidas). Además, un NP concreto puede actuar como neurotransmisor en una sinapsis y ser liberado extrasinápticamente para ejercer acciones moduladoras u hormonales en otros lugares próximos o distantes que posean receptores para él. Por todo ello resulta muy difícil establecer exactamente todas las funciones que desempeña un determinado NP.

## Receptores de los NP

Hoy en día se conoce que más del 80 % de los receptores de NP son receptores acoplados a una proteína G (RAPG). Estos receptores, formados por una cadena única de 400 a 600 residuos de aminoácidos, contienen un lugar de reconocimiento para el ligando y un lugar de reconocimiento para una proteína G particular. Estructuralmente presentan siete tramos transmembrana constituidos por 22-28 residuos hidrófobos en forma de haces de hélices estrechamente empaquetados, separados por segmentos hidrófilos (Figuras 14 y 15) (Strader, 1994).

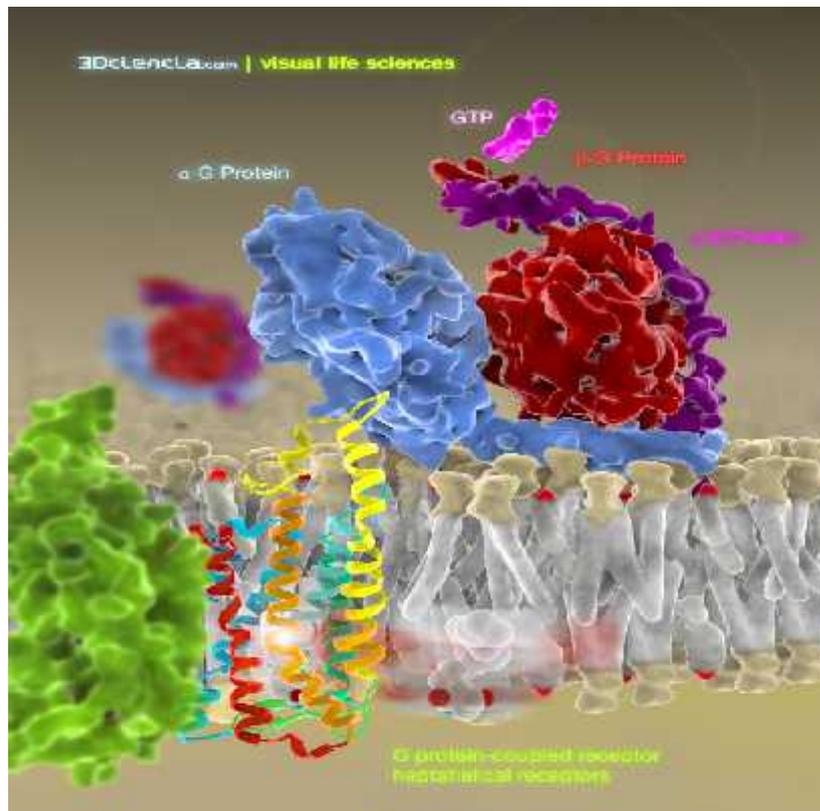
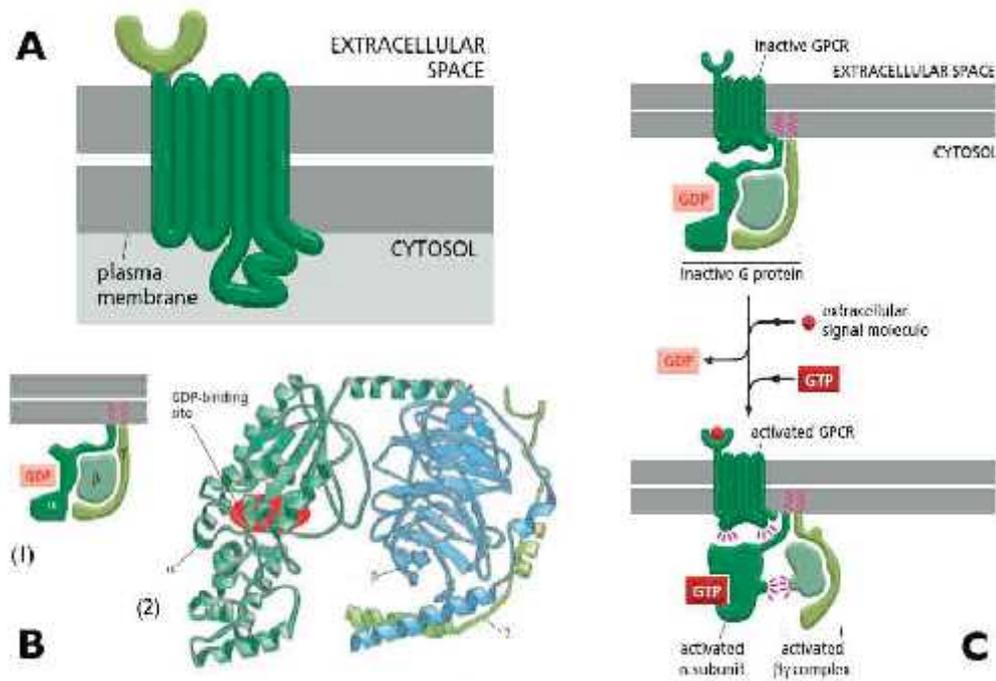
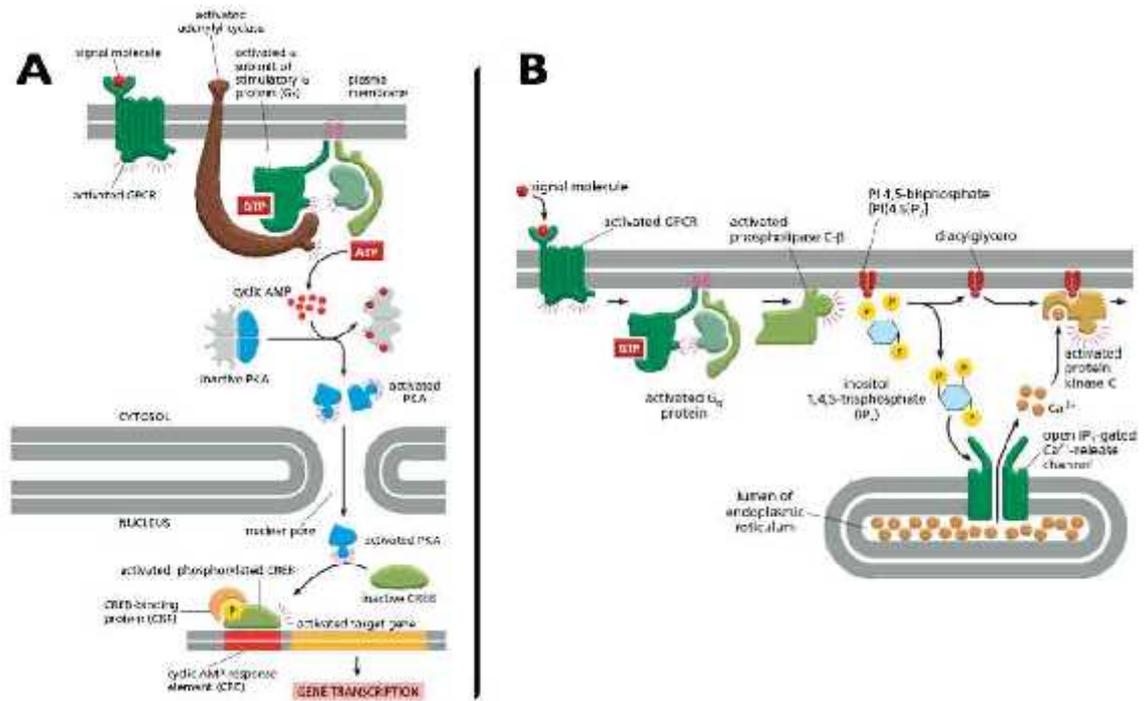


Figura 14: Estructura de un receptor de la familia de los RAPG o de los siete dominios transmembranas. Se ilustra una representación del receptor en tres dimensiones. (Procedente de visual life science).



**Figura 15:** Receptor acoplado a proteína G (RAPG). **A.** Estructura del receptor con sus siete dominios transmembrana. **B.** Estructura de una proteína G inactiva con sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  en una representación esquemática (1) y tridimensional (2). **C.** Activación de una proteína G por un RAPG (Modificado de Alberts, 2008).

La unión del NP a su receptor provoca la activación de una enzima, generalmente una adenilato ciclasa, que convierte ATP en AMPc (Figura 16, A). Este AMPc se combina con una proteincinasa dependiente de adenilato ciclasa (proteincinasa A), que consta de una subunidad reguladora y otra catalítica. La interacción del AMPc con la subunidad reguladora provoca la liberación de la unidad catalítica, que puede actuar sobre el ADN y producir efectos a largo plazo sobre el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular. Otros NP actúan a través de la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, que da lugar a la formación de otro grupo de segundos mensajeros, como el diacilglicerol y el inositol trifosfato (Figura 16, B). También existen receptores de NP acoplados a guanilato ciclasa o tirosinacinasas.



**Figura 16:** Mecanismos efectores de la proteína G. **A.** Vía de proteincinasa A (PKA). **B.** Vía del fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) (Modificado de Alberts, 2008).

La identificación de los receptores de NP ha supuesto un gran avance, pues el hecho de que poseen sus propias dianas celulares con sistemas de segundos mensajeros, apoya que posean un papel fisiológico propio. También se han descrito proteínas modificadoras de la actividad del receptor, que pueden provocar que dos NP diferentes, aunque relacionados, sean capaces de unirse al mismo receptor, lo cual abre un campo importante en el estudio de la plasticidad de los receptores (Massot 1996; McLatchie 1998).

### Clasificación de los NP

Se han realizado diversas clasificaciones de los NP según diferentes criterios, como son su localización tisular o estructura y secuencia de aminoácidos; este hecho ha llevado a dividir a los NP en familias a veces con funciones similares o incluso

solapadas. En la Tabla 10 se muestran los principales NP de mamíferos y se incluyen algunos de los recientemente descubiertos.

<p><b>HIPOTALÁMICOS</b>            Hormona liberadora de tirotrópina (TRH)            Somatostatina (SS)            Hormona liberadora de corticotropina (CRH)            Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)            Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH)            Orexinas A y B (hipocretinas 1 y 2)</p> <p><b>HIPOFISARIOS</b>            Oxitocina            Vasopresina            Hormona adrenocorticotropa (ACTH)            Hormona estimuladora de melanocitos            Prolactina            Hormona de crecimiento (GH)            Hormona estimulante del folículo (FSH)            Hormona luteinizante (LH)            Hormona estimulante del tiroides            Secretoneurina</p> <p><b>PÉPTIDOS GASTROINTESTINALES Y PANCREÁTICOS</b>            Péptido intestinal vasoactivo (VIP)            Colecistocinina (CCK)            Gastrina            Insulina            Glucagón            Motilina            Amilina            Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC)            Galanina            Secretina            Neuropeptido Y            Polipeptido pancreático            Péptido tirosina-tirosina</p>	<p><b>PÉPTIDOS OPIOIDES</b>            Metencefalina (Met-Enk)            Leu-encefalina (Leu-Enk)            Dinorfina            -endorfina</p> <p><b>TAQUICININAS</b>            Sustancia P            Neurokinina A (Sustancia K)            Neurokinina B            Neuropeptido K            Hemokinina 1</p> <p><b>OTROS</b>            Angiotensina II            Bombesina            Bradicinina            Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC)            Neurotensina            Neuropeptido FF            Péptido natriurético cerebral</p> <p><b>NUEVOS</b>            Péptido regulador de la cocaína y anfetaminas            Endomorfina 1 y 2            Nociceptina/Orfanina            Nocistatin            Péptido liberador de prolactina            Urocortina            Cortistatina            Apelina</p>
---	--

**Tabla 10:** Clasificación de los principales NP de mamíferos. (Modificado de Garcia-Lopez, 2002).

## **Desarrollo farmacológico en el campo de los NP**

Existen al menos tres tipos de acciones farmacológicas con las que se puede modificar la acción de los NP: antagonistas, agonistas e inhibidores de las peptidasas. Los primeros antagonistas fueron de naturaleza peptídica, la mayoría análogos D-sustituidos (formas dextrógiras). Uno de los primeros antagonistas sintetizados fue el de la SP, [D-Pro<sup>2</sup>, D-Phe<sup>7</sup>, D-Trp<sup>9</sup>] (Folkers, 1982), si bien diez años después se desarrolló un antagonista no peptídico (Snider, 1991). Otro descubrimiento importante, mostró que butiril-derivados del GMPc antagonizan la acción de la CCK, y esto se siguió del desarrollo de antagonistas más potentes para la CCK por parte de varios laboratorios.

Muchos de estos compuestos pueden atravesar la BHE, por lo que pueden ser empleados en patologías del SNC. Betancur y colaboradores publicaron una lista con más de 100 compuestos para distintos receptores peptidérgicos, entre ellos unos 20 compuestos para los receptores CCK<sub>B</sub> y NK1 (SP), y casi 30 para el receptor de la angiotensina AT1 (Betancur, 1997).

Algunas claves para el empleo de antagonistas de NP como potenciales fármacos radican en que éstos, en general, tienen una acción moderada en comparación con los neurotransmisores clásicos. Además, al ejercer un papel de tipo modulador, el bloqueo de sus receptores provoca efectos menos drásticos que al bloquear, por ejemplo, receptores GABAérgicos o glutaminérgicos. Muchos de los NP son liberados preferentemente en condiciones de fuerte activación neuronal y/o situaciones patológicas, por lo que sus antagonistas no tendrán efectos bajo condiciones de normalidad y en cambio sí actuarán en sistemas alterados en los que exista una liberación neuropeptídica acentuada (Hokfelt, 2000). La importancia de estas circunstancias radican en el hecho de que el bloqueo de receptores peptidérgicos llevará apareado muchos menos efectos secundarios. La reciente demostración de la eficacia

clínica de los antagonistas NK1 en la depresión (Kramer, 1998) nos puede servir como ejemplo, ya que en su estudio se demostraron muy escasos efectos secundarios, al contrario de lo que ocurre con los tratamientos antidepresivos de última generación como son los inhibidores de la recaptación de serotonina. Esto no resulta sorprendente si tenemos en cuenta que estos fármacos actúan sobre *todas* las neuronas 5-HT, y no sólo las asociadas con el control emocional.

Además, el hecho de que con frecuencia exista más de un receptor para un mismo NP abre posibilidades para el diseño de antagonistas específicos frente a un determinado receptor involucrado en una función determinada (Branchek, 2000). Este principio ha sido importante en el campo de las monoaminas, donde ya han sido desarrollados varios subtipos específicos de agonistas y antagonistas.

En contraste, el desarrollo de los agonistas ha sido mucho más limitado, ya que encontrar una molécula de este tipo con acción potente y específica entraña una elevada dificultad. En contra de esto, un ejemplo sería la síntesis de un potente agonista del receptor CCK<sub>B</sub>, que además atraviesa la BHE (Durieux, 1992), así como un potente analgésico opioide (Dooley, 1994). Una alternativa a los agonistas peptidérgicos son los inhibidores de las peptidasas que, al prevenir la escisión enzimática de los NP, refuerzan la transmisión peptídica y ejercen un efecto agonista. Así, la inhibición del catabolismo de la encefalina supone un potencial tratamiento para el dolor y la adicción a los opioides. De este modo se han desarrollado drogas que inhiben dos enzimas, la endopeptidasa neutra 24.11 y la aminopeptidasa N, encargadas de la degradación de la encefalina (Roques y Noble, 1995).

En conclusión, parece que los NP ejercen sus funciones principales cuando el sistema nervioso padece algún estímulo estresante, agresión o enfermedad (Hokfelt, 1991). En este sentido se piensa que los NP actuarían como una importante vía de

señalización en dichas situaciones y que la comunicación peptidérgica funcionaría como un “lenguaje” del cerebro enfermo susceptible de convertirse en una importante diana para el desarrollo farmacológico en diversas patologías (Hokfelt, 2000).

## 2.3 TAQUICININAS

Las taquicininas (TK) constituyen la más extensa familia de péptidos conocida en los metazoos y está formada por elementos con actividad neurotransmisora presentes en mamíferos, anfibios, moluscos e invertebrados. Como su nombre indica, las TK se caracterizan por poseer una rápida y potente actividad contráctil de la musculatura, aunque también se ha demostrado el papel fundamental que desempeñan en el control y regulación de diversas acciones fisiológicas. Aunque durante muchos años se pensó que tenían únicamente un origen neuronal, hoy se sabe que están presentes en diversos tejidos de la anatomía de diferentes especies animales. En todas las especies que poseen esta familia de péptidos, éstos ejercen su acción mediante la unión y activación de diferentes isoformas de RAPG del tipo *rhodopsin-like*. El descubrimiento de las TK en vertebrados no mamíferos se remonta a la década de los 40, momento en que se aisló en una especie de pulpo mediterráneo una sustancia desconocida –que posteriormente sería conocida como eledoisina- con capacidad para disminuir la presión sanguínea, contraer la musculatura lisa intestinal y estimular la salivación de una forma profusa en perros y ratas (Erspamer, 1949). En invertebrados, tras varias décadas de investigación, se confirmó la existencia de estos péptidos en estructuras nerviosas de la langosta migratoria (Schoofs, 1990) y en glándulas salivares de una especie de mosquito (Champagne y Ribeiro, 1994). La estructura primaria de las TK se encuentra bastante conservada entre diferentes especies animales, tanto vertebrados como invertebrados. Esta alta estabilidad estructural sugiere una fuerte presión selectiva a lo largo de la

evolución, es decir, las mutaciones que implican cambios conservadores en la secuencia de aminoácidos favorecen su supervivencia evolutiva (Almeida, 2004).

### **Estructura de las TK de los mamíferos**

Las TK de mamíferos, anteriormente conocidas como neurocininas, constituyen una familia de péptidos integrada clásicamente por tres miembros: sustancia P (SP), neurokinina A (NKA) y neurokinina B (NKB). Posteriormente se han sumado el neuropéptido K (NPK) y el neuropéptido gamma (NP ) -ambas formas elongadas de la NKA-, la hemokinina-1 (HK-1) y las endoquininas (Tabla 11).

Desde el punto de vista químico, todas las TK de mamíferos presentan dos zonas definidas: una secuencia pentapeptídica característica común en el extremo hidrofóbico carboxi-terminal, **Phe-X-Gly-Leu-MetNH<sub>2</sub>**, (Regoli, 1994), y una secuencia amino-terminal, variable en las diferentes TK, que es la responsable de su selectividad. Según el residuo que ocupe la posición *X* en la secuencia C-terminal, se distinguen dos tipos de TK: las aromáticas, en las que *X* es un aminoácido aromático (Phe, Tyr), y las alifáticas, en las que es un aminoácido alifático (Val, Ile). De forma característica, todas las TK son aminopéptidos, es decir, presentan un grupo amino en la metionina carboxi-terminal. Mientras que el extremo amino-terminal define la especificidad de las TK frente al subtipo específico de receptor (Schwyzer, 1987), la secuencia C-terminal es la encargada de la interacción y activación de dicho receptor, a través de la cual ejercerá sus funciones biológicas (Cascieri, 1992; Krause, 1992; Maggi, 1995). La amidación de la metionina terminal es esencial para su funcionamiento, y por ello los péptidos *tachykinin-like* de los invertebrados, con una arginina en el C-terminal, son incapaces de activar los receptores taquicinérgicos (RTK) de mamíferos.

<u>TAQUICININA</u>	<u>SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS <sup>a</sup></u>
Sustancia P (SP) (11 aa)	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Neurokinina A (NKA) (10 aa)	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Neurokinina B (NKB) (10 aa)	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Neuropéptido K (NPK) (36 aa)	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Neuropeptido $\gamma$ (NP $\gamma$ ) (21aa)	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Hemokinina-1 (HK-1) (11 aa)	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Endokinina A (EKA) (47 aa)	Asp-Gly-Gly-Glu-Glu-Gln-Thr-Leu-Ser-Thr-Glu-Ala-Glu-Thr-Trp-Val-Ile-Val-Ala-Leu-Glu-Glu-Gly-Ala-Gly-Pro-Ser-Ile-Gln-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Val-Lys-Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Endokinina B (EKB) (41 aa)	Asp-Gly-Gly-Glu-Glu-Gln-Thr-Leu-Ser-Thr-Glu-Ala-Glu-Thr-Trp-Glu-Gly-Ala-Gly-Pro-Ser-Ile-Gln-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Val-Lys-Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
Endokinina C (EKC) <sup>b</sup> (14 aa)	Lys-Lys-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu.NH <sub>2</sub>
Endokinina D (EKD) <sup>b</sup> (14 aa)	Val-Gly-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu.NH <sub>2</sub>

Tabla 11: Secuencia de los diferentes NP que integran la familia de las TK de mamíferos. A) Los aminoácidos subrayados son los que conforman la secuencia C-terminal común de las TK. En negrita se representa el residuo aromático o alifático correspondiente. B) Péptido relacionado con las TK (*tachykinin-like*).

Mientras que la secuencia de la SP, NKA y NKB es idéntica en todos los mamíferos en los que se ha estudiado, la del resto de TK varía entre diferentes especies.

La SP fue la primera TK descubierta (Von Euler y Gaddum, 1931) y supuso el punto de

partida de una larga historia de investigación en este campo. Cincuenta años después se aislaron en la médula espinal del cerdo la NKA y NKB (Kangawa, 1983; Kimura, 1983), con diferencias respecto a la SP en la actividad farmacológica a nivel central y periférico y en su afinidad por el subtipo de RTK. En los años siguientes se encontraron péptidos estructural o funcionalmente parecidos en el SNC de varios vertebrados y anfibios, como el NPK (Nawa, 1984; Tatemoto, 1985) y el NP (Kage, 1988), que son formas elongadas de la NKA. En el año 2000 se encontró una nueva TK en el ratón con actividad reguladora de la linfopoyesis B y expresión principalmente en tejido no neuronal, a la que se llamó HK-1 (Zhang, 2000). El descubrimiento de la HK-1 dio paso a la descripción de un nuevo grupo de TK, las endoquininas, con una estructura variable entre diferentes especies animales. En humanos, la HK-1 presenta una secuencia que coincide en sus seis últimos aminoácidos con la SP, mientras que la EKA y EKB son formas elongadas por el extremo N-terminal de la HK-1 (la EKA es un péptido de 47 aminoácidos, mientras que la EKB, de 41 aminoácidos, es una forma truncada de la EKA) (Kurtz, 2002; Page, 2003). Mientras que la EKA y EKB poseen la secuencia clásica ya comentada de las TK, la EKC y EKD tienen una estructura *tachykinin-like* (Phe-X-Gly-Leu-LeuNH<sub>2</sub>), variante de la forma clásica. Esta variación en su estructura hace que la EKC y EKD no presenten afinidad por ninguno de los tres RTK.

En la última década se ha propuesto la inclusión de nuevos péptidos periféricos similares a las TK en esta familia. Mediante búsqueda bioinformática se identificó el péptido-1 similar a las TK del cromosoma 14, C14TKL-1, ampliamente expresado en tejidos periféricos y con actividad agonista frente al receptor NK1 a pesar de su secuencia *tachykinin-like* (Phe-Tyr-Gly-Tyr-Met-NH<sub>2</sub>) (Jiang, 2003). Su gen y secuencia precursora todavía no se han identificado, por lo que la inclusión de C14TKL-

1 como una nueva TK y la consideración de su gen como *TAC5* sería prematura. También en 2003 (Zimmer, 2003) se descubrió la virokinina bovina, una TK codificada por un gen del virus respiratorio sincitial bovino procesado y liberado por células de mamíferos infectadas, y por tanto no codificada por el genoma de ningún mamífero. Esta TK tiene la capacidad de infectar e interferir en la función de diferentes tipos de células periféricas. La secuencia primaria de la virokinina está muy conservada en todos estos virus. Podría representar una nueva forma de mimetismo molecular, que beneficiaría al virus al permitirle interactuar con los RTK para, de esta forma, modular la respuesta inflamatoria e inmune del huésped.

### **Localización y acciones de las TK**

Desde hace más de una década, la activación de los RTK se ha implicado en una gran variedad de acciones biológicas. Se ha descrito su participación en la modulación y transmisión de la percepción del dolor, regulación del comportamiento emocional y otras funciones autonómicas a nivel del sistema nervioso central, modulación de la contractilidad del músculo liso, vasodilatación, sensibilidad visceral, inducción de la inflamación neurogénica y hematopoyesis a nivel periférico, activación del sistema inmune y activación de la secreción de glándulas endocrinas (Longmore, 1997). Aunque clásicamente se ha considerado a las terminaciones nerviosas sensibles a capsaicina como la principal fuente de TK a nivel periférico (Lundberg, 1996; Maggi y Meli, 1988), hoy en día se sabe que existen otras fuentes neuronales y no neuronales que originan las TK a este nivel. De hecho, el descubrimiento de la HK-1 en 2000 (Zhang, 2000) supuso la ruptura del dogma que establecía que la presencia de las TK estaba restringida de forma exclusiva al tejido neuronal, y que realizaban su acción a nivel periférico mediante su liberación desde terminaciones nerviosas. La existencia de TK ha

sido comprobada no sólo en células no neuronales del sistema inmune (Weinstock, 1988), inflamatorio (Khare, 1998) y endotelio vascular (Linnik y Moskowitz, 1989), sino también en las células tirotrópicas y somatotrópicas de la hipófisis anterior (Brown, 1991), en células enterocromafines (Simon, 1992), en fibroblastos (Bae, 2002) y células epiteliales (Chu, 2000), células musculares lisas intestinales y de la vía aérea (Khan y Collins, 1994; Maghni, 2003), en diferentes tipos de órganos reproductores femeninos (Pintado, 2003), circulando en la sangre (Pernow, 1983) e incluso en la placenta, un órgano carente de inervación (Muñoz, 2010; Page, 2000). A nivel del tracto gastrointestinal, las TK actúan como neurotransmisores en diferentes circuitos nerviosos que regulan la motilidad gastrointestinal, secreción y funciones vasculares. También colaboran en la transmisión nerviosa espinal aferente que inerva el tracto gastrointestinal y desempeñan funciones en la respuesta del intestino a la inflamación. Las TK coexisten con la acetilcolina, principal neurotransmisor de las neuronas excitatorias que inervan el músculo intestinal, y actúan como cotransmisores de dichas neuronas. La transmisión excitatoria está mediada por NK1R (sobre todo en las células intersticiales de Cajal) y NK2R en el músculo. Las TK también participan en la neurotransmisión excitatoria lenta de las sinapsis neuro-neuronales a través de los receptores NK1 y NK3, afectando a la motilidad del intestino. A nivel del epitelio intestinal, la activación de los receptores NK1 y NK2 estimula la secreción de fluidos. Además, las TK son liberadas desde las terminaciones centrales de las neuronas gastrointestinales aferentes en la médula espinal, participando en las vías nociceptivas (Shimizu, 2008). La NKB, que en principio se creía restringida al SNC, hoy se sabe que presenta una expresión periférica tan amplia como la SP. Esta TK ha sido descrita en la placenta humana y de rata (Page, 2000), así como en el útero (Pinto, 2001) y otros tipos de células reproductivas no neuronales de ratón (Pintado, 2003). Además se ha

relacionado con el desarrollo de preeclampsia (Page, 2000; Pinto, 2004). Recientemente se ha descubierto la presencia del receptor NK3 en osteoclastos de la médula ósea de ratón, y se ha sugerido que la NKB activa la formación de osteoclastos y la resorción ósea a través de dichos receptores (Ichiki, 2011). Tanto la HK-1 como las endoquininas A, B, C y D se expresan de forma preferente en células no neuronales. De hecho, la expresión predominantemente periférica y elevada potencia agonista frente a los receptores NK1 que presentan las endoquininas A y B, llevó a postular que éstas endoquininas en realidad podrían ser los principales ligandos endógenos del receptor NK1, actuando a través de un mecanismo endocrino-paracrino, en tejidos no innervados en los que la SP no se expresa (Page, 2004; Page, 2003).

Han sido descritas varias moléculas con capacidad de unión a las TK. En el suero de pacientes con fibrosis de médula ósea se han encontrado complejos de SP y fibronectina. La fibronectina es un componente de la matriz extracelular de la médula ósea que comparte cierta similitud con el receptor NK1 y podría ejercer un papel protector en la digestión de la SP, donde SP (1-4) se comporta como un regulador negativo de la hematopoyesis (Rameshwar, 1995; Rameshwar, 2003). También se ha encontrado similitud estructural entre el receptor NK1 y el factor de crecimiento hematopoyético proteico transmembrana inductor del receptor NK1. Este factor se une de forma no covalente a la SP e induce la expresión del receptor NK1 endógeno en los fibroblastos de la médula ósea (Bandari, 2002).

### **Genes de las TK**

Las TK de mamíferos están codificadas por tres genes diferentes denominados preprotaquiininas (*TAC*) 1, *TAC3* y *TAC4*, de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de Genes de la Organización del Genoma Humano

(<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>). Esta nomenclatura sustituye a los términos previamente usados *PPT-A/PPT-I (TAC1)*, *PPT-B/PPT-II (TAC3)* y *PPT-C (TAC 4)* (Patacchini, 2004). El gen *TAC1* codifica la SP, NKA y sus formas elongadas NPK y NP ; *TAC3* codifica la NKB y *TAC4* la HK-1 y endoquininas (Tabla 12). El primer gen clonado fue *TAC1*, en 1983 a partir de cerebro bovino (Nawa, 1983). Inicialmente se pensó que se trataba de dos genes diferentes, uno que contenía la SP (*TAC1*) y otro que codificaba la NKA (al que se llamó *TAC2*). Hoy sabemos es un mismo gen constituido por siete exones, de los que el exón 3 y 6 codifican la SP y NKA, respectivamente. También se conoce que, mediante *splicing* (o empalme) alternativo del exón 6, este gen puede dar lugar a cuatro isoformas diferentes de ARNm: las formas  $\alpha$  y  $\beta$ , que sólo codifican la síntesis de SP, y las formas  $\gamma$  y  $\delta$ , que codifican la síntesis tanto de SP como NKA (Harmar, 1990; Kawaguchi, 1986; Nawa, 1984). Para la formación de NPK y NP se precisa la inclusión o exclusión del exón 4 en las formas  $\gamma$  y  $\delta$  de *TAC1*, respectivamente (Kage, 1988; Tatamoto, 1985).

GEN	NOMBRE ALTERNATIVO	TAQUICININA CODIFICADA	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	NÚMERO DE ACCESO
TAC1	PPT-A o PPT-I	SP/NKA NPK/NP $\gamma$	7q21-q22	NM_013996 (isoforma $\alpha$ ) NM_003182 (isoforma $\beta$ ) NM_013997 (isoforma $\gamma$ ) NM_013998 (isoforma $\delta$ )
TAC3	PPT-B o PPT-II	NKB	12q13-q21	NM_013251
TAC4	PPT-C	HK-1/EKA, EKB, EKC, EKD	17q21.33	NM_170685

**Tabla 12:** Genes de las TK humanas (Pennefather, 2004).

Como consecuencia de este *splicing* a nivel de *TAC1*, la SP puede expresarse a nivel regional de forma aislada, mientras que la NKA siempre estará acompañada de la expresión de SP. Se ha comprobado la expresión de *TAC1* en todos los tejidos humanos, especialmente en cerebro, corazón, bazo, colon, cerebro fetal, glándula mamaria (Maggi, 1995, 1997; Pinto, 2004) y placenta (Marzioni, 2005). Además se ha visto cómo cada especie animal tiene una diferente expresión de las distintas variantes de *splicing* que no parece ser específica de cada tipo de tejido, cuyo significado se desconoce. En humanos las isoformas más abundantes son la *TAC1* y *TAC1*, ambas codificantes tanto de SP como NKA (Bannon, 1992; Lai, 1998; Pintado, 2003), por lo que en muchas ocasiones ambas TK se sintetizan y liberan como cotransmisores tanto a nivel central como periférico (Maggi, 2000).

El gen *TAC3* codifica exclusivamente la NKB (Hokfelt, 2001; Kotani, 1986; Page, 2000). Este gen está compuesto por siete exones, de los cuales el 5 codifica la NKB. Aunque su organización en humanos y bovinos es similar a la de *TAC1*, su procesamiento es mucho menos complejo (Page, 2001). En humanos existen dos isoformas precursoras, la *TAC3* y *TAC3*, que se diferencian en los últimos 24 aminoácidos del extremo C-terminal (Page, 2005). Aunque inicialmente no se consiguió aislar la NKB en tejidos periféricos mediante estudios de inmunorreactividad (Moussaoui, 1992), estudios posteriores demostraron una intensa expresión del ARNm de NKB en la placenta humana (Page, 2000). De hecho, se ha comprobado que la expresión de *TAC3* en tejidos humanos es igual o incluso más amplia que la de *TAC1* (Pinto, 2004). Estos hallazgos sugieren que la NKB debe ejercer un papel similar al de la SP tanto en el SNC como en tejidos periféricos. Se piensa que esta TK está implicada en la cascada de señales neuroendocrinas que tienen lugar en la pubertad, ya que

mutaciones en el gen *TAC3* son causa de hipogonadismo hipogonadotrópico normosómico idiopático (Topaloglu, 2010).

El descubrimiento de *TAC4*, el tercer gen de las TK de mamíferos, por Zhang et al supuso un hito en el campo de las taquicininas. Estos autores identificaron el nuevo gen a partir de células hematopoyéticas de estirpe linfóide B de la médula ósea de ratón al que llamaron preprotaquiquinina-C, posteriormente renombrado como *TAC4*. Éste gen era responsable de la codificación de una TK con amplia distribución periférica no neuronal hasta entonces desconocida (Zhang, 2000). Un par de años más tarde Kurtz aislaron y caracterizaron en humanos el gen ortólogo al *TAC4* descrito en ratón, responsable de un péptido, la HK-1, que por compartir la secuencia carboxi terminal característica de las TK fue incluido como miembro de esta familia (Kurtz, 2002). En humanos, este gen está integrado por cinco exones, de los que el 2 codifica la HK-1. Mediante *splicing* alternativo puede dar lugar a cuatro isoformas distintas de ARNm: *TAC4*, *TAC4-1*, *TAC4-2* y *TAC4-3*. Cada variante codifica de una forma diferencial los diferentes péptidos que conforman el grupo de las endoquininas: EKA, EKB, EKC y EKD. Así, mientras que la EKB está codificada por las cuatro isoformas, la EKA y la EKC únicamente lo están por *TAC4* y la EKD por *TAC4-3*. La distribución de las cuatro isoformas de *TAC4* no ha sido definida completamente, aunque sí se sabe que *TAC4* y *TAC4-3* se expresan ampliamente en diferentes tejidos periféricos humanos, particularmente en la placenta, y de una forma escasa en el cerebro (Page, 2004; Page, 2003). Recientemente se han descubierto niveles muy elevados de expresión de este gen en el epitelio olfatorio de ratón, tejido de origen neurológico (Tran, 2011).

## **Síntesis de las TK**

La síntesis de las TK responde al modelo general de síntesis de NP ya comentado anteriormente. Tras la traducción de las formas maduras de ARNm de los genes *TAC1*, *TAC3* y *TAC4*, se genera un prepropéptido (gran polipéptido constituido por un péptido de señal, una o varias copias del NP en cuestión y una o más regiones espaciadoras). El péptido señal, de entre 16-30 aminoácidos localizado en el extremo Nterminal, permite que el péptido en formación se acople y atraviese el retículo endoplasmático para inmediatamente después ser escindido, dando lugar al propéptido. Este propéptido es transportado al aparato de Golgi, donde se separan las regiones espaciadoras del péptido activo final y éste es empaquetado en gránulos secretores para, en el caso de las neuronas, ser transportados a lo largo del axón hasta las terminaciones nerviosas (Pennefather, 2004).

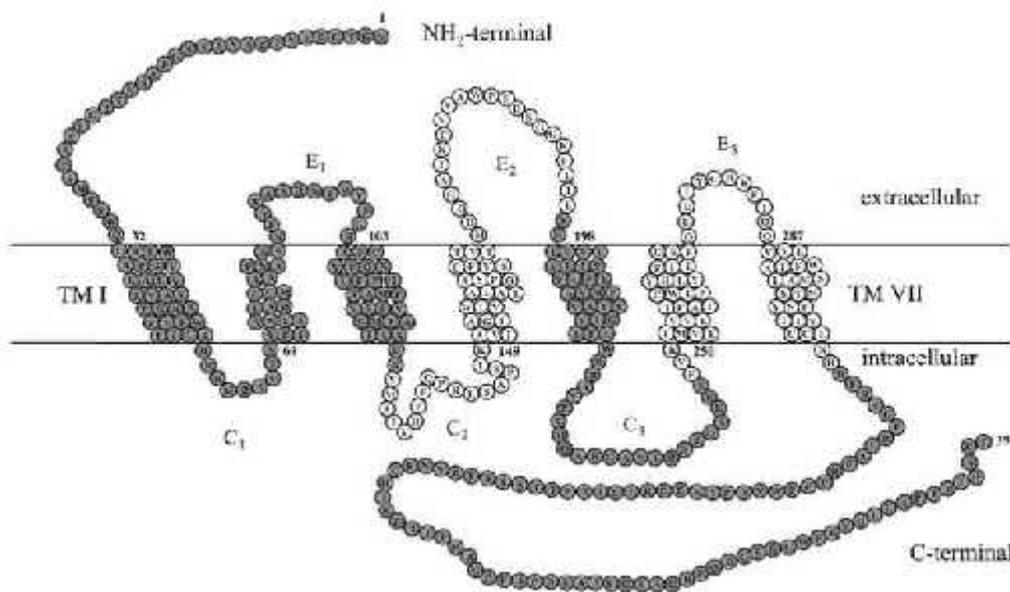
## **2.4 RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS (RTK)**

### **Estructura y localización de los RTK**

En la década de los 80, el análisis comparativo de las propiedades farmacológicas de las diferentes TK permitió describir la existencia de tres RTK específicos: NK1, NK2 y NK3 (Burcher y Buck, 1986; Lee, 1982; Maggi, 1987; Regoli, 1987; Teichberg, 1981). El primero en ser clonado fue NK1 (Masu, 1987), lo cual supuso un importante avance no sólo por ser el primer receptor neuropeptídico clonado sino también porque permitía por primera vez imaginarlo y reconstruirlo físicamente. Pocos años después se lograron clonar varios RTK más (Nakanishi, 1991; Ohkubo y Nakanishi, 1991).

Actualmente sabemos que las TK se unen a RAPG de tipo 1 o *rodhopsin-like*. Estos receptores pertenecen a una gran superfamilia de receptores que ocupan

aproximadamente el 1 % del genoma. Poseen una estructura de siete dominios hidrofóbicos transmembrana, tres bucles extracelulares, tres bucles intracelulares, un dominio extracelular amino-terminal y otro citoplasmático carboxi-terminal (Figura 17). Por su estructura típica, también se les llama receptores de los siete dominios transmembrana. Realizan sus acciones a través de la activación de una o más proteínas G: la unión de un agonista a su receptor específico en la superficie celular causa un cambio conformacional en éste que permite su interacción con la proteína G, formándose así un complejo de alta afinidad: agonista-receptor-proteína G. Para la activación de los RTK es fundamental su interacción con la región pentapeptídica carboxi-terminal común a las diferentes TK ya mencionada.



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de los RTK (la imagen corresponde al receptor NK2). Las regiones codificadas por los exones 1, 3 y 5 aparecen mostradas en gris, y las codificadas por los exones 2 y 4 se muestran en blanco. La disposición de los exones es idéntica en el receptor NK1 y NK3 (Pennefather, 2004).

Los RTK han sido clonados en diferentes especies de mamíferos. En todos ellos, el receptor NK1 es una proteína de 407 aminoácidos; en cambio, la estructura del receptor NK2 (398 aminoácidos en humanos) y NK3 (465 aminoácidos en humanos) varía entre diferentes especies. En todas las especies NK3 es más largo que NK1 y

NK2, presentando un extremo amino-terminal más elongado. Se piensa que la alta conservación interespecie de la estructura del receptor NK1 es debida a la necesidad de éste de interactuar con más de un ligando de alta afinidad. El grado de coincidencia en la secuencia de aminoácidos entre los RTK humanos es del 47 % entre NK1 y NK2, del 51 % entre NK1 y NK3, y del 41 % entre NK2 y NK3 (Almeida, 2004; Pennefather, 2004).

Aunque SP, NKA y NKB actúan como agonistas completos de cada uno de los tres RTK, cada TK presenta una afinidad y potencia de activación diferente para cada tipo de receptor (Tabla 13). De esta manera la SP es el ligando preferido del receptor NK1, la NKA lo es del NK2 y la NKB del NK3 (Hastrup y Schwartz, 1996; Lecci y Maggi, 2003; Maggi, 2000; Regoli, 1994). El NPK y NP , como formas elongadas de NKA que son, se unen con mayor preferencia al receptor NK2, aunque también poseen alta afinidad por NK1 (Burcher, 1991; van Giersbergen, 1992). Tanto la HK-1 como la EKA y EKB presentan alta afinidad por el receptor NK1, con una potencia de activación similar a la de la SP, por lo que produce efectos casi idénticos a ésta a nivel periférico (Kurtz, 2002; Morteau, 2001; Page, 2003; Zhang, 2000). En cambio, la EKC y la EKD no muestran afinidad por los RTK, lo cual se explica por diferencia en la secuencia peptídica del extremo C-terminal (Page, 2003).

Tipo de Receptor	Orden de afinidad para las TK
NK1R	SP > NKA > NKB
NK2R	NKA > NKB > SP
NK3R	NKB > NKA > SP

**Tabla 13:** Comparación de la afinidad de las TK por cada tipo de RTK.

Los RTK son reconocidos por las TK endógenas con una selectividad moderada, lo cual podría explicarse por la conformación similar que adoptan en el sitio de unión al receptor. Sin embargo, pequeños cambios (tan sólo en un aminoácido) pueden influir notablemente en la conformación espacial de las cadenas laterales peptídicas, haciendo que un determinado péptido sea más potente y selectivo como agonista o antagonista para un determinado receptor.

La expresión del receptor NK1 es muy amplia tanto a nivel central como periférico, habiéndose detectado en neuronas, células del endotelio vascular, músculo y diferentes células del sistema inmunológico (Ho, 1997; Lai, 1998; Patacchini y Maggi, 2001; Stewart-Lee y Burnstock, 1989; Tsuchida, 1990). En todas estas células el receptor NK1 está constitutivamente expresado, a diferencia de la médula ósea, donde lo está de una manera inducible (Bandari, 2002). En cambio, el receptor NK2 está presente principalmente en la periferia y de una manera muy selectiva en ciertos núcleos cerebrales (Pennefather, 1993; Saffroy, 2001; Por último, NK3 se expresa sobre todo en el SNC aunque también se ha visto en ciertos tejidos periféricos como placenta, útero, músculo esquelético, vena porta y mesentérica de la rata, pulmón e hígado y ciertas neuronas entéricas de diferentes especies (Fioramonti, 2003; Lecci y Maggi, 2003; Tsuchida, 1990). También se han observado marcadas diferencias interespecies en el patrón de expresión y distribución de cada tipo de receptor. Este hallazgo sugiere que cada uno de los receptores puede ejercer funciones similares y superpuestas sin la necesidad de aumentar el repertorio de receptores (Pennefather, 2004).

### **Genes de los RTK**

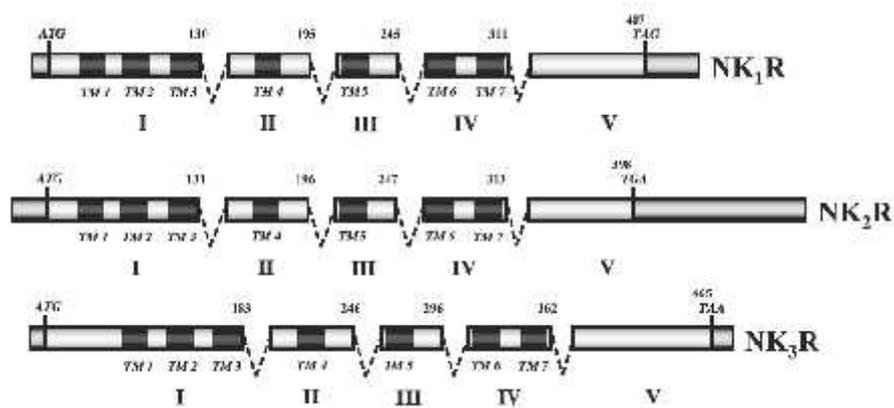
Los tres RTK, NK1, NK2 y NK3 están codificados por tres genes diferentes, denominados gen del receptor de taquiquinina 1 (*TACR1*), *TACR2* y *TACR3*,

respectivamente (Tabla 14). Estos tres genes poseen una organización similar, constituida por una región codificante dividida en cinco exones separados entre sí por intrones situados en idéntica posición (Figura 18).

GEN	RECEPTOR CODIFICADO	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	NÚMERO DE ACCESO
TACR1	NK1R	2p13.1-p12	NM_001058
TACR2	NK2R	10q11-q21	NM_001057
TACR3	NK3R	4q25	NM_001059

**Tabla 14.** Genes de los RTK humanos.

Esta estructura de intrones y exones, presente en menos del 10 % de los genes que codifican RAPG, permite la potencial expansión de la familia de RTK a través de la generación de variantes funcionales mediante la combinación y empalme de los diferentes exones, lo cual obvia la necesidad de contar con receptores adicionales. Así, a modo de ejemplo, el exón 2 marca el límite entre el inicio del segundo bucle intracelular y el final del segundo extracelular, mientras que el exón 4 marca el límite entre el final del tercer bucle intracelular y el inicio de la terminación C-terminal intracelular, por lo que el empalme prematuro de cualquiera de esos exones podría modular la longitud de los bucles del receptor o la longitud de la terminación N- o C- terminal, modificando de esta manera la conformación del receptor (Candenas, 2002).



**Figura 18.** Representación esquemática de la organización de los genes que codifican los RTK humanos. Las regiones codificantes de los genes se dividen en cinco exones (I-V) separados entre sí por cuatro intrones (señalados por líneas discontinuas). Los segmentos transmembrana codificados por cada exón aparecen con color negro e identificados con las letras TM (1-7). También se indican las posiciones de los aminoácidos en los lugares de *splicing* (Pennefather, 2004).

Existen relaciones evolutivas interespecies de estos receptores y tienen un origen monofilético, es decir, los tres RTK derivan de un mismo gen (Altschul, 1997; Saitou y Nei, 1987). En los vertebrados, existen tres tipos de RTK originados por duplicaciones a partir de un receptor ancestral todavía presente en la *Ciona intestinalis*, animal marino urocordado. Además la presencia y posición de los intrones ha permanecido altamente conservada a lo largo de la evolución. La alta conservación en la estructura de las TK y sus receptores en diferentes organismos que divergieron evolutivamente hace millones de años constituye una prueba del importante papel fisiológico que desempeña este sistema.

Existen diferentes motivos para pensar que debe existir un RTK no descubierto aún. La falta de afinidad de la SP (1-7), un metabolito activo formado por el fragmento N-terminal de la SP, por ninguno de los tres RTK conocidos apoya la teoría de que debe existir un receptor alternativo que reconozca dicha región terminal. También sustenta esta teoría la baja afinidad de la EKC y EKD por los tres receptores conocidos, que sugiere la existencia de otro receptor para estos ligandos. Además, se ha visto cómo en

el hígado y pulmón de ratón la NKB induce la formación de edema por un mecanismo independiente de los tres RTK conocidos (Grant, 2002). En contra de los argumentos anteriores figura el hecho de que en cada especie de mamífero existe sólo un miembro de cada tipo de RTK, lo cual sugiere que los tres receptores que conocemos en la actualidad constituirían una familia completa. Tampoco se podría descartar la existencia de nuevos RTK que pertenezcan a una familia diferente de receptores acoplados a una proteína G. Esta hipótesis estaría apoyada por hechos como la interacción de los opioides con los RTK, así como la unión de análogos de la SP y antagonistas del receptor NK1 con receptores opioides. Además, se ha comprobado cómo la naloxona se comporta como antagonista de un análogo de la SP (Lei, 1991; Sakurada, 1999).

## **2.5 SUSTANCIA P**

La SP es la TK estudiada desde hace más tiempo, siendo la mejor caracterizada en cuanto a su distribución, liberación, acciones fisiológicas e implicación fisiopatológica en diversos procesos patológicos. En 1931 Euler y Gaddum, tratando de encontrar acetilcolina en extractos hipotalámicos e intestinales equinos, describieron por primera vez la presencia de un factor resistente a la atropina con una potente capacidad para estimular la contracción muscular y disminuir la presión sanguínea (Von Euler y Gaddum, 1931). Comprobaron que este compuesto mantenía su actividad cuando, tras evaporarse, se convertía en un polvo seco, motivo por el que lo llamaron “P” (de *powder*, polvo en inglés) en sus anotaciones (Hokfelt, 2001). En la década de los 50 se comprobó la existencia de SP en diferentes áreas del cerebro, médula espinal, plexo nervioso de la capa muscular del tracto gastrointestinal y nervios y ganglios del sistema nervioso periférico (Pernow, 1983). A comienzos de la década de los 70, Susan Leeman

y colaboradores fueron los primeros en identificar la SP como un undecapéptido (Chang, 1971), sintetizar el compuesto (Tregear, 1971) y poner a punto un radioinmunoensayo para SP (Powell, 1973).

La SP es soluble en agua y alcohol, e insoluble en éter y cloroformo. Tolera ebullición a pH entre 1-7 y es rápidamente destruída en medio alcalino. En electroforesis se desvía hacia el cátodo a  $\text{pH} < 10$  y su punto isoeléctrico está próximo a 9. La actividad biológica de la SP es inactivada por la tripsina y la pepsina y resiste la acción de las carboxipeptidasas (Pernow B, 1983).

La secuencia de 11 aminoácidos de la SP es la siguiente:

**H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>**

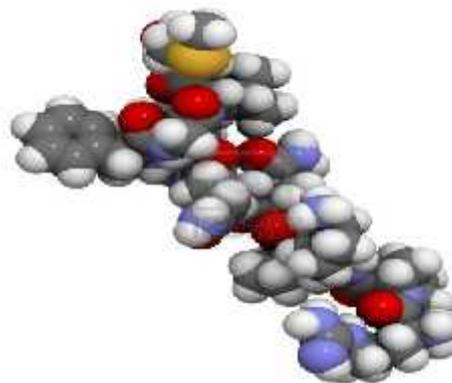


Figura 19: Imagen tridimensional de la SP

Como ya se ha comentado, la SP ejerce sus funciones mediante su unión con el receptor NK1, del que es su principal ligando y por el que más afinidad presenta de los tres RTK descritos hasta ahora. La porción N-terminal de la SP presenta la máxima capacidad para inducir la desensibilización del receptor NK1 (Vigna, 2001). De hecho, diferentes estudios han mostrado que fragmentos N-terminales como SP(1-4) y SP(1-7) son activos metabólicamente (Joshi, 2001; Zhou & Nyberg, 2002), y que la formación de los mismos puede ser bloqueada por la acción de inhibidores específicos de las

endopeptidasas. Paradójicamente, el metabolito SP (1-7) tiene algunos efectos similares y otros opuestos a los de la SP completa (Hallberg & Nyberg, 2003).

### **Mecanismo de acción**

La SP realiza acciones como neurotransmisor, neuromodulador (al regular la actividad de otros neurotransmisores) y hormona, ya que ejerce su actividad a distancia de los lugares donde es liberada. Su actividad neurotransmisora fue propuesta ya en la década de los 50 (Lembeck, 1953). Tras ser liberada del terminal presináptico en respuesta al estímulo despolarizante, la SP se inactiva fundamentalmente a través de la degradación por peptidasas, no participando en su inactivación la recaptación de este NP. Benuck et al describieron en 1975 una EPN (endopeptidasa neutra) parcialmente purificada a partir de cerebro de rata con actividad proteolítica sobre la SP (Benuck & Marks, 1975). Posteriormente se comprobó que la coexistencia en las mismas células de esta EPN con receptores NK1 reducía marcadamente la unión de la SP a éstos últimos, debido a la degradación acelerada que experimentaba la SP (Okamoto, 1994). La EPN (EC 3.4.24.11, también llamada encefalinasas) es una metalopeptidasa de membrana que cataliza la ruptura de aminoácidos hidrofóbicos no terminales por su vertiente amino. Actúa sobre diferentes péptidos además de la SP, como son la insulina (cadena B), péptidos opioides, encefalinas, péptido natriurético auricular, péptido natriurético cerebral, neurotensina y neuropéptido Y. Esta enzima es inhibida primariamente por el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), phosphoramidon y thiorfan, y es reactivada por el zinc. La EPN es idéntica al antígeno común de la leucemia aguda linfoblástica común, un marcador proteico de la leucemia aguda linfocítica (Eberlin, 2012; Offermanns y Rosenthal, 2008; Painter, 1988).

Intracelularmente, la unión SP/NK1 receptor es seguida de una hidrólisis de fosfoinositol, movilización del calcio, aumento de los niveles de AMPc y la activación

del sistema proteínquinasa activadora de mitógenos (MAPK) (Luo, 1996) (Figura 20). La ruta endocelular tras la internalización del complejo SP/NK1 receptor ha sido estudiada en profundidad por Grady et al (Grady, 1995). Gracias a los estudios con microscopia confocal usando SP marcada y anticuerpos anti receptor NK1, se puede detallar la ruta intracelular así como los procesos de degradación y reciclaje de dichos receptores. Se ha podido determinar que la SP y su receptor se internalizan rápidamente mediante la acción de la clatrina en los denominados endosomas tempranos. En ausencia de SP, el receptor NK1 se localiza en la membrana plasmática, pero cuando la célula está expuesta a este NP, el receptor y el ligando se unen, tras activarse la ruta, se inicia la agrupación en la membrana y se desplazan conjuntamente hacia el interior de la célula por endocitosis. Es posible que este método no sea el único método de entrada como aseguran algunos autores. Se ha observado que una vez el complejo se internaliza se dirige a la región perinuclear donde se origina una acidificación del endosoma provocando la disociación de SP y receptor NK1. Finalmente, se comprueba que los receptores aparecen de nuevo en la membrana. Existen distintas teorías para explicar este fenómeno; síntesis de nuevos receptores, inserción de receptores preformados o reciclaje de los receptores internalizados. Por el contrario, el ligando se degrada enzimáticamente en el interior de los endosomas ya que no aparece de nuevo en la membrana plasmática junto con los receptores. Parece ser que este mecanismo de endocitosis y reciclaje de los receptores sería uno de los mecanismos responsables de la regulación de los fenómenos desensibilización y resensibilización ante la presencia de SP, de este modo la célula se haría insensible a cantidades excesivas de SP y se conseguiría una regulación celular frente a este NP.



incluyendo al hombre, si bien su distribución es muy variable entre diferentes áreas anatómicas. En el SNC la SP se localiza en la corteza cerebral en las áreas somatomotora, somatosensorial, visual y olfatoria. Sin embargo, es a nivel subcortical donde se hallan los mayores niveles de este péptido: los núcleos caudado y putamen presentan una densidad muy elevada de somas celulares que expresan SP, presentando proyecciones de fibras axonales a la sustancia negra. De esta forma el área nigroestriada supone una de las áreas de mayor concentración del péptido. También hallamos SP en los núcleos amigdalares del hipocampo, cápsula interna y séptum. En el tronco encefálico se localiza entre los principales núcleos neuronales (destacando el trigémino), y en la médula espinal sobre todo a nivel de las astas posteriores. A nivel del sistema nervioso periférico, la SP se localiza principalmente en las neuronas sensoriales primarias de los ganglios espinales, cadena cervical simpática y en los ganglios yugular, nodoso y trigeminal (Beaujouan, 2004). En el resto del organismo, la SP está ampliamente distribuida, localizándose alrededor de los vasos sanguíneos o terminaciones nerviosas en la mayoría de órganos y tejidos: piel, folículos pilosos, glándulas sudoríparas, aparato respiratorio, genitourinario y cardiovascular, en los plexos mientérico y submucoso del sistema digestivo e incluso en la pulpa dentaria (Pernow, 1983; Severini, 2002; Shimizu, 2008). También se ha aislado en la práctica totalidad de fluidos del organismo: sangre, LCR, orina (Altuntas, 2014), saliva (Parris, 1990), líquido peritoneal (Sanfilippo, 1992), leche materna (Ducroc, 1995)... Es decir, presenta una distribución universal.

## **2.6 RECEPTORES NK1**

El receptor NK1 pertenece al tipo de receptores denominados “RAPG”. Su estructura consiste en siete hélices transmembrana conectadas entre sí a través de tres

bucles intra y otros tres extracelulares, con un extremo N-terminal extracelular y otro C-terminal intracelular. El núcleo lo conforma el haz de siete  $\alpha$ -hélices transmembrana contraídas y estabilizadas como resultado de sus mutuas interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y una red de enlaces en este entorno lipofílico. Los bucles extracelulares se organizan en cuatro filamentos de hoja plegada-, mientras que los intracelulares carecen de estructura determinada (Okada y Palczewski, 2001; Stenkamp, 2002). Aunque se desconoce el mecanismo exacto, parece ser que, tras la unión al ligando, la traducción de la señal en los RAPG se lleva a cabo mediante una reordenación del haz de  $\alpha$ -hélices que induce un cambio de conformación en la superficie citoplasmática del receptor que es transmitido a la proteína G para que complete el mecanismo de señal (Ernst y Bartl, 2002). Los hallazgos de diferentes trabajos defienden que el receptor NK1 responde a un modelo de activación multimodal, en el que la unión de cada ligando induce en el receptor una conformación única estable y específica que le permite activar una o más proteínas G de una manera ligando-específica (Lecat, 2002; Palanche, 2001). Esta conformación adoptada por el receptor está condicionada tanto por el ligando (Hastrup y Schwartz, 1996) como por el microambiente, es decir, el medio extracelular y la composición fosfolipídica de la membrana en la proximidad del receptor (Villar, 1998). Se ha demostrado la existencia de diferentes conformaciones activas tanto en el receptor NK1 como en el NK2, presentando cada una de ellas una forma preferencial para activar cada uno de los diferentes mecanismos efectores además de una afinidad diferente por los distintos agonistas y antagonistas (Hastrup y Schwartz, 1996; Lecat, 2002; Maggi y Schwartz, 1997; Palanche, 2001).

En los últimos años se ha intentado identificar el sitio de unión de la SP con el receptor NK1. Como resultado de numerosos trabajos se cree que esta unión, dado el carácter hidrofílico de la SP, se produce a nivel de múltiples dominios de la cara

extracelular del receptor (Figura 21). En este sitio de unión ejercen un papel destacado algunos aminoácidos de los bucles extracelulares (como el Asn96 y Met181, del primer y segundo bucle, respectivamente), hélices transmembrana (His108 y Tyr287, de la III y VII hélice, respectivamente) y extremo N-terminal (Asn23, Gln24 y Phe 25) (Fong, 1993; Huang, 1994; Kage, 1996). Los antagonistas no peptídicos, por su naturaleza hidrófoba, tienen su lugar de unión al receptor NK1 localizado más profundamente, entre los segmentos transmembrana, a diferencia de la SP (Figura 21) (Gether, 1993). De esta manera, la unión de la SP al receptor NK1 estabiliza una serie de conformaciones activas del receptor que serán reconocidas por la proteína G específica (Holst, 1998). En este aspecto, se conoce que algunos aminoácidos como Phe268, Glu78 o Tyr205 ejercen un papel importante en la estabilización de esa conformación activa o en la activación del mecanismo de señal.

Gly166 y Tyr216 son residuos de las hélices transmembrana IV y V, respectivamente, que también se relacionan con el mantenimiento de la conformación correcta del receptor NK1 de cara a la selectividad del mismo por la SP. Así, mutaciones que afectan a estos dos aminoácidos aumentan la afinidad del receptor NK1 por diferentes ligandos como NKA, NKB y septide (Ciucci, 1996). En el caso de Gly166, éste se encuentra sustituido de forma natural en los receptores NK2 y NK3, por lo que se piensa que juega un papel importante en las características de afinidad divergentes que los tres RTK han adquirido a lo largo de la evolución (Kage, 1996).

Existen dos isoformas funcionales del receptor NK1: una larga o completa (407 aminoácidos) y otra corta o truncada en el extremo C-terminal (311 aminoácidos) (Fong, 1992; Mantyh, 1996). Este extremo contiene una serie de sitios que median en la fosforilación e internalización del receptor al activarse tras su unión al ligando. Por este motivo la isoforma corta, que podría considerarse un subtipo de receptor, presenta una

afinidad por la SP diez veces inferior (Fong, 1992), y además podría no seguir las mismas vías de señalización (Dery, 2001), presentar defectos de internalización (Bohm, 1997) y resistencia a la desensibilización homóloga en comparación con la isoforma larga (Li, 1997). En humanos, la isoforma larga del receptor NK1 es la más prevalente en el cerebro, mientras que la truncada está más representada en tejidos periféricos (Caberlotto, 2003). De la misma forma se ha comprobado una expresión diferente de los genes *TAC1* y *TAC4* en tejidos humanos, con un predominio de *TAC4* en tejidos periféricos, especialmente en los del sistema inmune. Se ha sugerido que podría existir cierta correlación entre la preferencia con la que algunos tejidos expresan la isoforma larga o corta del receptor NK1 y cómo esos mismos tejidos expresan predominantemente SP o endoquininas y otros péptidos *SP-like* (Page, 2003).

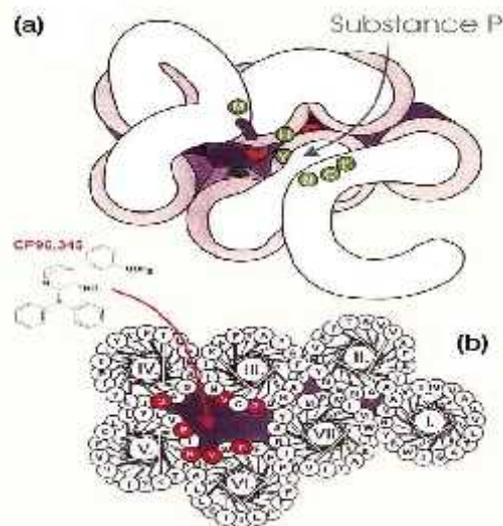


Figura 21. Representación esquemática que muestra los sitios de unión de la SP (a) y del antagonista no peptídico CP-96,345 en el receptor NK1 (b). La primera imagen muestra la visión extracelular en la que se representan los bucles y la región N-terminal. Los círculos verdes representan los residuos que interactúan con la SP. En la segunda imagen las siete regiones transmembrana se muestran como hélices, y los círculos rojos representan los sitios de unión del antagonista CP-96,345. (Hokfelt, 2001).

Existen varios subtipos de receptor NK1 según la afinidad que presenten por ciertos ligandos. Tanto [3H]SP o como [3H][Pro9]SP tienen gran afinidad y potencia (Mussap, 1993) frente a los receptores NK1 denominados “clásicos”, que son aquellos para los que la SP es la única TK endógena con alta afinidad. Otra modalidad de receptor NK1 es el que presenta alta afinidad por ligandos del tipo [Glp6,Pro9]SP(6-11) (septide). Estos NK1, denominados “septide-sensibles”, poseen alta afinidad por varias TK como la NKA, NPK, NP y NKB, así como algunos análogos de la SP y NKA, ligandos todos ellos que presentan una débil afinidad por los receptores NK1 “clásicos”. En cambio la SP, al igual que los agonistas y antagonistas selectivos de los receptores NK1 “clásicos”, poseen una alta afinidad por ambos tipos de receptores (Beaujouan, 1999). La SP (6-11) sólo reconoce el sitio de unión de alta afinidad “septide sensible”, que resulta ser la mínima longitud cadena necesaria para activar el receptor, que coincide con los últimos seis aminoácidos de la EKA y B (Beaujouan, 2004; Page, 2004; Severini, 2002). Un tercer subtipo de receptor ha sido descrito con el nombre “nuevo NK1 sensible”. Éste posee alta afinidad por TK de mayor longitud y no por septide o SP (6-11) (Beaujouan, 2004). Se ha sugerido que los subtipos de “clásico” y “septide sensible” en realidad representan variantes en la conformación del mismo receptor con capacidad para activar diferentes sistemas de transducción de la señal y de esta forma ejercer diferentes funciones. Así, estudios in vitro han demostrado que los receptores “clásicos” están ligados a la activación de una adenilato ciclasa mientras que los “septide sensibles” lo están a la activación de una fosfolipasa C (Sagan, 1997; Torrens, 2000). Sin embargo, en estudios in vivo los receptores clásicos estaban ligados a la activación de una fosfolipasa C y raramente a una adenilato ciclasa (Beaujouan, 2004).

La diferente expresión de los subtipos de receptor NK1 en cada localización ha ofrecido nuevas perspectivas en el campo de la regulación de estos receptores, al establecer una relación entre cada TK con su subtipo de receptor y su mecanismo efector. Esto amplía las implicaciones fisiológicas derivadas de la interacción entre la SP, endoquininas *SP-like*, NKA y NKB con el receptor NK1, pues el hecho de que cada TK pueda activar el receptor NK1 en diferentes sitios permite emplear antagonistas selectivos este receptor capaces de bloquear diferentes acciones con diferente potencia (Page, 2005).

### **2.6.1 Agonistas de los receptores NK1**

Las características que determinan la selectividad de un péptido por el receptor NK1 son: 1) un residuo prolina en la posición 4 (N- terminal) que determina la conformación del péptido; 2) una pareja de aminoácidos aromáticos en las posiciones 7 y 8, normalmente Phe-Phe o Phe-Tyr, y 3) un aminoácido neutro o básico en la posición 5, que en el caso de la SP es Gln (Severini, 2002). La conformación de un péptido en una solución desempeña un papel muy importante en la selectividad del mismo frente al receptor (Almeida, 2004).

En la tabla 15 se muestra la estructura de varios agonistas lineales del receptor NK1. Uno de los primeros agonistas preparados para aumentar la selectividad y afinidad fue el metil éster SPOMe, que es varias veces más activo que la SP pero se metaboliza rápidamente in vivo. El agonista PG-SPI, con características ácidas que le protegen frente a la degradación enzimática, fue aislado en la piel de una especie de rana australiana y presenta una actividad similar a la SP (Broccardo, 1995). La introducción de una prolina en la posición 9 y 10, [Pro9]SP y [Pro10]SP respectivamente, dio lugar a agonistas selectivos del receptor NK1, probablemente debido a restricciones en la

conformación de su estructura (Lavielle, 1990). [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP es una modificación de la SP que presenta estabilidad frente a la degradación in vitro además de una elevada potencia y afinidad por el receptor NK1 (Drapeau, 1987).

Entre los agonistas también se han empleado diversas TK aisladas de especies de animales no mamíferos. El primero de ellos fue la eledoisina, un undecapéptido aislado a principios de la década de los 60 a partir de un extracto obtenido de las glándulas salivares de la *Eledone moschata*, una especie de pulpo mediterráneo (Erspamer y Anastasi, 1962). En humanos con hipofunción de la glándula lacrimal el empleo de eledoisina aumenta la secreción de lágrimas hasta en un 200 % (Impicciatore, 1973). A partir de fragmentos de la piel de una especie de rana de América del Sur llamada *Physalaemus biligonigerus*, se descubrió que presentaban una actividad similar a la eledoisina. Un par de años después se descubrió la estructura peptídica de esta sustancia, a la que se llamó fisalemina (Anastasi, 1964) y que presentaba una actividad agonista frente a los tres tipos de RTK de mamífero (Bertaccini, 1976), presentando por ellos una afinidad incluso mayor que la de sus ligandos endógenos naturales, como la SP (Regoli, 1989). La fisalemina es considerada, junto con la SP, el prototipo de agonista frente al receptor NK1. La administración de fisalemina estimula de forma muy potente la secreción lacrimal en diferentes animales.

NOMBRE	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
SP	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>	
SPOMe	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met-OMe	
PG-SPI	pGlu	Pro	Asn	Pro	Asp	Glu	Phe	Phe	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>	
[Pro <sup>5</sup> ]SP	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Pro	Leu	Met-NH <sub>2</sub>	
[Pro <sup>10</sup> ]SP	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Pro	Met-NH <sub>2</sub>	
[Sar <sup>9</sup> ,Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]SP	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Sar	Leu	Met(O <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	
Fisalemina (PHYS)	pGlu	Ala	Asp	Pro	Asn	Lys	Phe	Tyr	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>	
Eleoisisina	pGlu	Pro	Ser	Lys	Asp	Ala	Phe	Ile	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>	
Casinina	Asp	Val	Pro	Lys	Ser	Asp	Gln	Phe	Val	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>
LomTKLMa	Gly	Pro	Ser	Gly	Phe	Tyr	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>			
DiMeC7	pGlu	MePhe	Phe	Sar	Leu	Met-NH <sub>2</sub>						
[Arg <sup>6</sup> ,Sar <sup>9</sup> ]SP(6-11)	Arg	Phe	Phe	Sar	Leu	Met-NH <sub>2</sub>						
Septide	pGlu	Phe	Phe	Pro	Leu	Met-NH <sub>2</sub>						
WS-Septide	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	Met-NH <sub>2</sub>						
GR73632	Ava	Phe	Phe	Pro	NMeLeu	Met-NH <sub>2</sub>						
	Orn	Phe	Phe	Gly	Leu	GluOBz						

Tabla 15: Principales agonistas peptídicos del receptor NK1 (Modificado de Almeida, 2004)

Unos años después se aisló otro dodecapéptido a partir de la piel de otra especie de rana, esta vez africana, la *Kassina senegalensis*, con estructura de TK y actividad agonista frente a los RTK y a la que se llamó casinina (Anastasi, 1977). Otros como LomTKLMa, una variante de la TK de insecto LomTK I, actúan como agonista del receptor NK1 en tejidos humanos, incluso con mayor potencia y afinidad que la propia SP (Torfs, 2002). La SP (6-11) es el fragmento mínimo con selectividad y actividad

frente al receptor NK1. Mediante modificaciones de su estructura se han creado diferentes agonistas. Entre éstos destaca por su potencia [Arg6,Sar9]SP(6-11) (Drapeau, 1987). En el caso de Septide y WS-Septide, su forma soluble en agua, la introducción de una prolina en la posición 9 les confiere un aumento en su selectividad (Laufer, 1986), sin embargo se observó que éstos presentan una alta variabilidad en su actividad en diferentes tejidos, por lo que probablemente exista un receptor sensible a septide (Maggi y Schwartz, 1997; Petitet, 1992).

### **2.6.2 Antagonistas de los receptores NK1**

El desarrollo de los antagonistas de la SP, sensibles y selectivos, ha permitido comprender mejor sus acciones biológicas y la fisiopatología del receptor NK1 (Muñoz, 2011). Durante la última década, la investigación en diferentes moléculas con actividad antagonista frente al receptor NK1 ha impulsado el desarrollo de nuevos compuestos con una prometedora actividad terapéutica en diferentes campos. Existen dos tipos de antagonistas del receptor NK1: peptídicos y no peptídicos. La mayoría de los trabajos realizados en el diseño y preparación de los antagonistas peptídicos se han centrado en la introducción de D-aminoácidos (formas dextrógiras o especulares a los L-aminoácidos). La tabla 16 muestra un listado con los principales péptidos con actividad antagonista frente al receptor NK1. El primero de ellos descrito fue [DPro2,DTrp7,9]SP, si bien su alta neurotoxicidad llevó a continuar la búsqueda de nuevos compuestos (Leander, 1981). Sobre la base del anterior se creó Spantide I, no muy activo y todavía neurotóxico (Folkers, 1984). Los esfuerzos por aumentar su potencia y disminuir su toxicidad llevaron a la creación de péptidos de segunda generación, entre los que se encuentra Spantide II, con alta actividad antagonista y baja neurotoxicidad probada en animales (Folkers, 1990).

NOMBRE	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
[DPro <sup>7</sup> ,DTrp <sup>7,9</sup> ]SP	Arg-DPro-Lys-Pro-Gln-Gln-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
Spantide I	DArg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-DTrp-Phe-DTrp-Leu-NH <sub>2</sub>
Spantide II	DLys <sup>4</sup> -Pro-Pal-Pro-DPhe <sup>8</sup> -Asn-DTrp-Phe-DTrp-Leu-NH <sub>2</sub>
[DPro <sup>9</sup> ,*Pro <sup>10</sup> ,Trp <sup>11</sup> ]SP	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-DPro-Pro <sup>+</sup> -Trp-NH <sub>2</sub>
[DPro <sup>4</sup> ,Trp <sup>7,9,10</sup> ,Phe <sup>11</sup> ]SP(4-11)	DPro-Gln-Gln-DTrp-Phe-DTrp-DTrp-Phe-NH <sub>2</sub>
[Pro <sup>6</sup> ,DTrp <sup>7,9</sup> ,MeLeu <sup>11</sup> ]SP(6-11)	Pro-DTrp-Phe-DTrp-Leu-MeLeu-NH <sub>2</sub>
[Orn <sup>6</sup> ,AspOBz <sup>11</sup> ]SP(6-11)	Orn-Phe-Phe-Gly-Leu-AspOBz
Sendide	Tyr-DPhe-Phe-DHis-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
[DTrp <sup>7</sup> ]Sendide	Tyr-DTrp-Phe-DHis-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
[Gln <sup>6</sup> ]Sendide	Gln-DPhe-Phe-DHis-Leu-Met-NH <sub>2</sub>

Tabla 16: Principales antagonistas peptídicos del receptor NK1  
(Almeida, 2004)

La modificación en los tres últimos aminoácidos (posición 9-11) de la SP produjo una serie de antagonistas, entre los que destaca [DPro<sup>9</sup>,\*Pro<sup>10</sup>,Trp<sup>11</sup>]SP por su potencia (Lavielle, 1994). También se desarrollaron octapéptidos y hexapéptidos. Entre los péptidos sin D-Trp destaca [Orn<sup>6</sup>,AspOBz<sup>11</sup>]SP(6-11), de demostrada potencia antagonista en el íleon de cobaya (Karagiannis, 1993). Sendide actúa como antagonista selectivo y extremadamente potente en la médula ósea de ratón (Sakurada, 1992); sus análogos [DTrp<sup>7</sup>]Sendide y [Gln<sup>6</sup>]Sendide se diferencian sólo en un aminoácido y son nuevos antagonistas con un comportamiento similar (Sakurada, 2002; Sakurada, 1994). Se ha realizado un esfuerzo por establecer cuál es la estructura peptídica más pequeña con actividad antagonista frente al receptor NK1. Uno de estos compuestos es el FK 888, (2-(N-Me)indolil)-CO-Hyp-Nal-NmeBzl, de elevada selectividad y afinidad por el receptor NK1 en íleon de cobaya (Fujii, 1992).

Por último, se han preparado una serie de compuestos cíclicos con una conformación rígida que aumenta su selectividad frente al receptor NK1. Ente éstos destacan FK224, GR82334, GR71251, L668169 e ITF1565, péptidos estudiados en diferentes animales de experimentación cuyo análisis de la estructura conformacional ha puesto las bases para el diseño de otros antagonistas no peptídicos (Hashimoto, 1992; Meini, 1994; Porcelli, 1999; Williams, 1993). De forma general, podemos decir que los antagonistas peptídicos presentan una afinidad por el receptor NK1 varias veces menor que sus agonistas naturales, inestabilidad metabólica e imposibilidad para atravesar la BHE, motivos que limitan su utilidad en estudios in vivo. Además, inyectados directamente en el SNC presentan baja potencia, incapacidad para discriminar entre RTK, actividad agonista residual parcial e inducen degranulación de mastocitos y neurotoxicidad (Lee, 1986).

Las limitaciones encontradas en los antagonistas peptídicos impulsó la búsqueda y desarrollo de nuevos antagonistas no peptídicos de diferente naturaleza: esteroidea, amonios cuaternarios derivados de la quinuclidina, derivados del triptófano, análogos de la piperazina o compuestos piperidínicos. El primer antagonista no peptídico descrito con actividad selectiva frente al receptor NK1 fue CP-96,345 que presentaba alta afinidad por el receptor NK1 y lugares de unión del calcio, por lo que tenía efectos sistémicos no relacionados con el RTK (Snider, 1991). Sobre la estructura de éste se elaboró CP-99,994 (Piedimonte, 1993), también con alta afinidad por el receptor NK1 pero baja biodisponibilidad. También sobre la base de CP-96,345 se sintetizó ezlopitant (CJ- 11,974) (Reed-Hagen, 1999), con actividad antiemética postquimioterapia comprobada hasta en un ensayo clínico en fase II (Hesketh, 1999). CP-122,721 es un análogo de CP-99,994 (McLean, 1996) cuya actividad antiemética, antidepresiva y antiinflamatoria ha sido bien estudiada sin alcanzar una repercusión clínica relevante.

L-732,138 (Figura 22), es aproximadamente 1.000 veces más potente para el receptor NK1 que para el NK2 y el NK3 en humanos y 200 veces más potentes en el receptor NK1 humano que en ratas (MacLeod, 1994). Es capaz de antagonizar el aumento de permeabilidad vascular de la piel, produce una atenuación de la hiperalgesia (Cahill, 2002) y ejerce una acción antitumoral contra varias líneas celulares tumorales humanas (Muñoz, 2007, 2007, 2008, 2010, 2011, 2012, 2012).

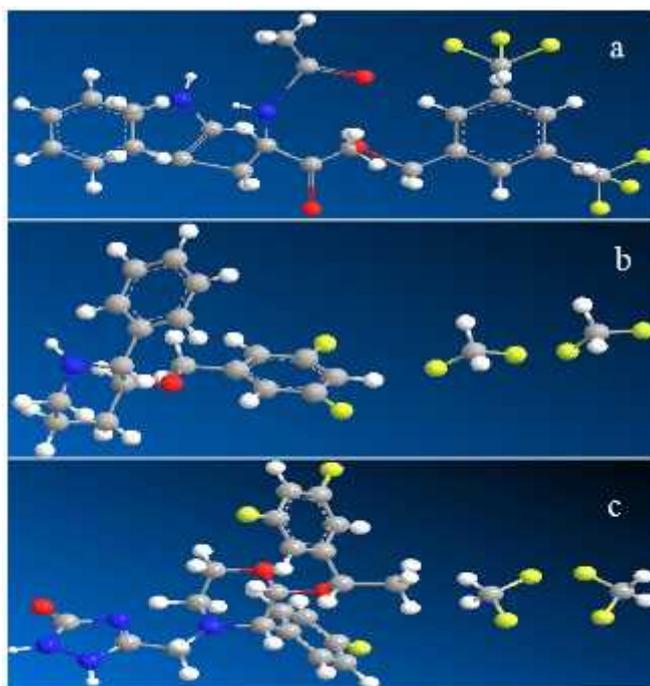


Figura 22. Representación tridimensional de la estructura química de L-732,138 (a), L-733,060 (b) y aprepitant (c). Los átomos de carbono están representados en gris, hidrógeno en blanco, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo y flúor en amarillo (Modificado de Rosso, Muñoz y Berger, 2012).

Por su repercusión clínica es importante L-733,060 (Figura 22), antagonista desarrollado a partir de CP-99,994 (Huang, 2003) muy bien estudiado, que presenta actividad analgésica (Parenti, 2012), antidepresiva (Guiard, 2004), ansiolítica y frente a trastornos del estado de ánimo (Rupniak, 2000), eficacia en la enfermedad inflamatoria hepática (Bang, 2003) y actividad antitumoral en diferentes líneas celulares humanas

(Muñoz, 2012; Muñoz, 2004; Muñoz, 2004; Muñoz, 2008; Muñoz, 2005; Muñoz, 2005; Rosso, 2008).

Entre estos antagonistas también destaca MK-869 (Figuras 22 y 23), conocido posteriormente como aprepitant (Figura 22), que ha sido empleado para el tratamiento del dolor (Chizh, 2007), prurito (Santini, 2012), migraña, emesis (Tattersall, 2000), trastornos psiquiátricos como depresión (Kramer, 1998) y como fármaco antitumoral (Kast, 2009; Muñoz y Rosso, 2010). La FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó la indicación de aprepitant oral para las náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia. Una proforma de este fármaco, fosaprepitant, está también aprobada para su empleo intravenoso (Navari, 2007).

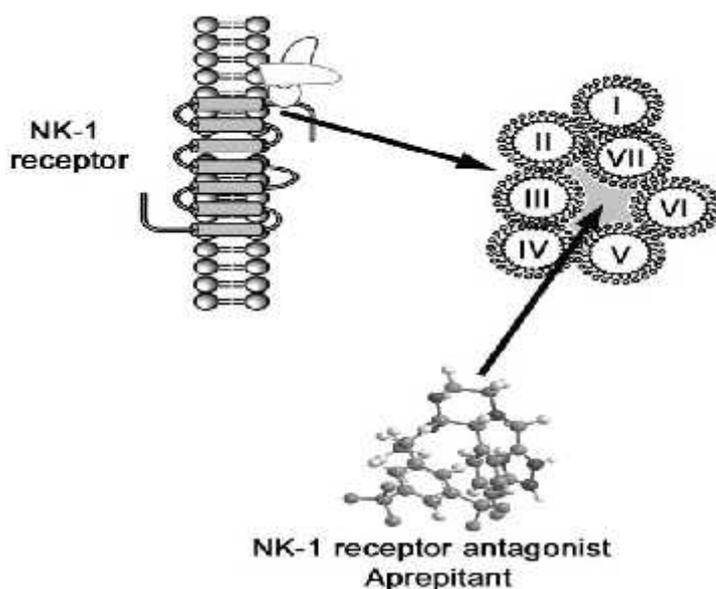


Figura 23: Sitios de unión al receptor NK1 de SP y aprepitant. El antagonista se une a los segmentos profundos transmembrana del receptor NK1 y la SP a sus hélices extracelulares (Muñoz, 2011)

## 2.7 EFECTOS FISIOLÓGICOS Y FISIOPATOLÓGICOS DEL SISTEMA SP/NK1 RECEPTOR

A concentraciones fisiológicas la SP ejerce múltiples acciones en todo el organismo. Entre ellas destacan las llevadas a cabo sobre el **sistema inmune** (SI) (Eglezos, 1991; Hartung y Toyka, 1989; McGillis, 1990; Maggi, 1997). La SP ejerce un papel inmunomodulador actuando tanto a través el SNC como periférico, y se ha llegado a pensar que forma parte del complejo sistema de la inmunidad innata (Pennefather, 2004). El balance entre NP proinflamatorios y antiinflamatorios resulta crucial para mantener una situación inflamatoria basal de reposo y de autotolerancia, de forma que la ruptura de este delicado equilibrio jugaría un papel relevante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes (Reinke y Fabry, 2006). El complejo SP-NK1 receptor desempeña un papel fundamental en la regulación de la actividad inmunológica, modulando la respuesta inflamatoria y, por ende, ante agentes infecciosos (Douglas y Leeman, 2011). Su papel etiopatogénico se ha relacionado con un gran número de procesos patológicos de esta índole. En líneas generales, la SP ejerce un efecto proinflamatorio en el SI, aumentando la respuesta inflamatoria a nivel del aparato respiratorio, gastrointestinal y musculoesquelético (O'Connor, 2004). La SP a través del receptor NK1, retrasa la apoptosis y, por tanto, aumenta la supervivencia de los neutrófilos (Bockmann, 2001), macrófagos (Kang, 2001) y precursores de linfocitos T y B (Zhang, 2000; Zhang y Paige, 2003). La SP también potencia la proliferación de los linfocitos T inducida por antígenos o mitógenos (Calvo, 1992). Los monocitos/macrófagos expresan SP de forma constitutiva, y la expresión de receptores NK1 está aumentada en células mieloides infiltrantes (Goode, 2000). Además, la SP estimula la secreción de citoquinas proinflamatorias por estas

células mononucleares En los focos inflamatorios de enfermedades inflamatorias crónicas como la colitis ulcerosa o el asma, tanto los macrófagos como los eosinófilos son productores activos de SP (Ho, 1997; Metwali, 1994; Pascual y Bost, 1990). Se ha demostrado que sus efectos se amplifican por la pérdida de su principal enzima degradante, la EPN, de las células epiteliales que resultan dañadas en los procesos crónicos (Hwang, 1993). La SP ha demostrado tener efectos directos sobre la respuesta funcional de los neutrófilos: induce la quimiotaxis, potencia la fagocitosis, la exocitosis y promueve el paso de situación de reposo a estado activado (Lloyds y Hallett, 1993; Tanabe, 1996). Además, a altas concentraciones la SP prolonga la vida media de los neutrófilos, aumenta su concentración intracelular de calcio y estimula la liberación de radicales O<sub>2</sub>- y de IL-8 por estas células (Lloyds y Hallett, 1993; Serra, 1994). La SP también aumenta la citotoxicidad de las células natural-killer, y reduce su actividad migratoria (Lang, 2003), aunque existen estudios más recientes en los que parece ejercer el efecto contrario (Monaco-Shawver, 2011). Las células dendríticas (CD), pertenecientes al sistema mononuclear fagocítico, forman parte de la inmunidad innata y actúan como las más potentes células presentadoras de antígenos de nuestro SI. La liberación de SP en el foco inflamatorio es capaz de reclutar CD inmaduras hacia el mismo (Lambrecht, 2001). El estímulo in vivo de CD con agonistas del receptor NK1 promueve una respuesta inmune del tipo CD4<sup>+</sup>- Th1 y CD8<sup>+</sup>- Tc (Mathers, 2007). Las CD expresan receptores NK1 y son capaces de aumentar la expresión de este receptor ante estímulos como lipopolisacáridos bacterianos (Janelsins, 2009; O'Connor, 2004). Además, tanto la SP como sus análogos a concentraciones fisiológicas inducen un efecto antiapoptótico sobre estas CD, mediado por el receptor NK1 (Janelsins, 2009). Recientemente se ha descrito que tanto la SP como la HK-1 inducen la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> memoria hacia células Th17, a través de la producción monocitaria de

IL-1 , IL-23 y TL1A. De esta manera, la SP y la HK-1, liberadas tanto por terminaciones nerviosas sensitivas como por células inflamatorias, estimularían la activación y producción de citoquinas de las células mieloides infiltrantes, lo que conduce a la generación de células Th17 y al inicio o mantenimiento de este tipo de respuesta inflamatoria (Cunin, 2011). Todo esto explica que, en situaciones en las que predomine la secreción de SP sobre otros NP anti-inflamatorios se favorezca la aparición de trastornos inflamatorios crónicos o autoinmunes.

Cada vez hay más evidencia que apoya la existencia de una comunicación activa y bidireccional entre SNC y SI (Elenkov, 2000; Steinman, 2004). De esta forma se acepta que el SNC puede estimular o inhibir la actividad de la inmunidad tanto innata como adquirida y, a su vez, el SI a través de la liberación de citoquinas puede influenciar la actividad del propio SNC. Algunos péptidos con funciones de señalización neural o neuroendocrina han demostrado presentar una potente actividad antimicrobiana, por lo que el SNC podría utilizarlos como agentes anti-infecciosos al enviarlos de forma rápida y precisa a los lugares infectados. Los NP tienen propiedades antimicrobianas y se comportan como moléculas anfipáticas, lo cual les permite alcanzar altas concentraciones tanto en el espacio acuoso que hay entre la terminación nerviosa y su receptor como en la membrana de la célula a la que se dirigen (Brogden, 2005). En concreto, la SP posee actividad antimicrobiana in vitro frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Kowalska, 2002). Así, el sistema SP-NK1 receptor se considera el principal mediador en la interacción recíproca existente entre el SI y el SNC (Hartung y Toyka, 1989; Maggi, 1997; Severini, 2002). Por ello, una secreción predominante de SP, de actividad proinflamatoria, sobre otros NP antiinflamatorios favorecerá la aparición de trastornos inflamatorios crónicos y

autoinmunes tanto en el SNC como en tejidos periféricos (Reinke, 2006). Esta capacidad del SNC para interactuar con el SI y el sistema endocrino estableciendo una comunicación bidireccional con ambos basada en un lenguaje químico de neurotransmisores, hormonas y citoquinas ha llevado a hablar de la existencia de un eje neuro-inmuno-endocrino (Blalock, 2002). La prevención de los efectos proinflamatorios de la SP, utilizando antagonistas de los receptores NK1, puede tener potencial efecto terapéutico en enfermedades inflamatorias tales como asma, sarcoidosis, bronquitis crónica, enfermedad inflamatoria intestinal, cistitis, artritis reumatoide (Anichini, 1997), y de hecho en cualquier enfermedad inflamatoria (O'Connor, 2004).

La SP y el receptor NK1 actúan como moduladores de la respuesta inmune en la **infección por el VIH**. Se han encontrado niveles de SP elevados en el plasma de pacientes infectados por el VIH (Douglas, 2008; Douglas, 2001). Los macrófagos y linfocitos de pacientes infectados por este virus expresan más SP, lo que llevó hace ya más de una década a plantear la hipótesis de que la interacción del VIH con la SP podría tener gran relevancia en la inmunopatogénesis de la infección por el VIH y SIDA (Ho, 2002). También se ha demostrado la implicación de esta TK en los trastornos neuropsiquiátricos presentes en individuos infectados por este virus (Ho y Douglas, 2004). El bloqueo de los receptores NK1 con aprepitant ejerce un efecto anti-VIH-1 en células mononucleares de sangre periférica, además de una sinergia con algunos inhibidores de las proteasas (Manak, 2010). Recientemente se ha comprobado que la SP aumenta la expresión del VIH-1 en neuroesferas de origen fetal infectadas por este virus (Schwartz, 2013). En los últimos años, se ha demostrado que el aprepitant inhibe la infección por VIH, (Wang, 2007). El aprepitant es el antagonista antirretroviral para VIH-1 más potente y esta actividad anti VIH es sinérgica con otros antirretrovirales por lo que hacen de él un excelente agente terapéutico. La asociación entre la depresión, la

ansiedad y el estrés con la progresión de la enfermedad del VIH sugiere que factores neurobiológicos y neurofisiológicos jugarían un papel importante en la modulación del VIH a través de las vías neuro-endocrino-inmunológicas. Así, el uso de antagonistas del receptor NK1 (aprepitant, por ejemplo) podría mejorar tanto el estrés emocional como la infección.

El control neuropeptídico del SI se inicia desde la propia **hematopoyesis medular**. Las células madre hematopoyéticas (CMH) y mesenquimales de la médula ósea responden a diferentes estímulos durante la hematopoyesis. La médula ósea está innervada por fibras nerviosas peptidérgicas y simpáticas, habiéndose encontrado fibras con expresión de TK (Fras, 2003). Esta innervación es necesaria para la retención de CMH y otros progenitores en la propia médula ósea (Afan, 1997), y se ha comprobado que cualquier alteración neural de la hematopoyesis se traduce en una disfunción inmunológica (Kang, 2004). Así, la liberación de neurotransmisores, entre los que destacan la SP y NK-A, resultaría fundamental para mantener una homeostasis hematopoyética. Todo esto ha llevado a hablar de la existencia de un eje neuro-inmuno-hematopoyético (Rameshwar y Gascon, 1997). La figura 24 representa los diferentes niveles de la hematopoyesis en los que participan tanto la SP como la NKA: en cada punto en el que actúa la SP, la NK-A realiza una acción hematopoyética opuesta y una retroalimentación negativa (Rameshwar y Gascon, 1995). De esta manera, la SP y la NK-A tienen efectos opuestos en cuanto a la proliferación de las CMH, regulando la misma por un mecanismo autocrino y/o paracrino (Kang, 2004). Estudios recientes señalan el probable papel de la enzima convertidora de angiotensina y un sistema renina-angiotensina propio de la médula ósea, a través del cual la angiotensina II actuaría de forma conjunta y coordinada con la SP y otros NP en la regulación de la hematopoyesis (Shen y Bernstein, 2011).

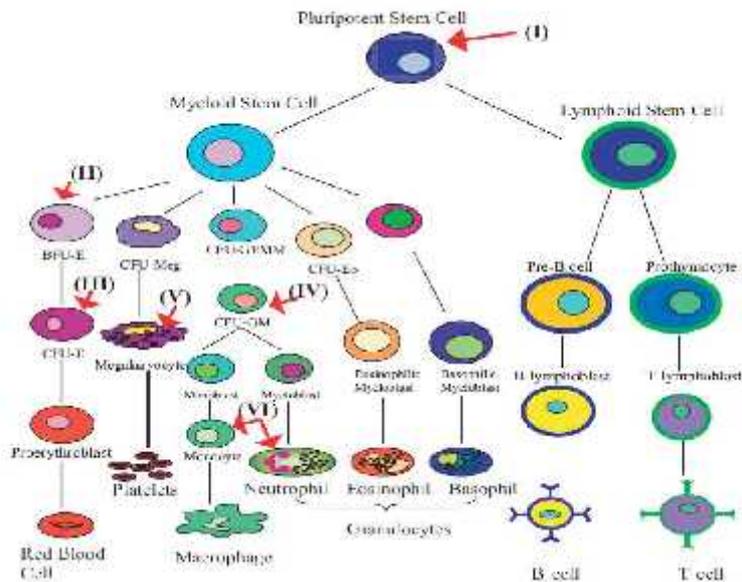


Figura 24. Resumen de las acciones hematopoyéticas de la SP y NK-A. (I) La SP tiene un efecto estimulador sobre los progenitores primitivos de la médula ósea. (II) La SP estimula la proliferación de los progenitores eritroides precoces (BFU-E) y tardíos (CFU-E). (III-VI) La SP tiene un efecto sinérgico con diversas citoquinas para inducir la proliferación de las colonias mixtas mieloide-eritroide. Las flechas indican estimulación hematopoyética por la SP (Kang, 2004).

A nivel del **sistema nervioso (SN)**, son numerosas las acciones en las que de manera fisiológica participa la SP. En la corteza cerebral, la SP es capaz de aumentar la actividad neuronal de manera intensa y duradera, actuando así como modulador neuronal (Hokfelt, 1982). También actúa sobre el eje hipotálamo-hipofisario produciendo un aumento en la liberación de hormonas (Baertschi, 1981). La localización clásica de liberación de la SP es la sustancia nigra, si bien sus acciones en esta localización son complejas y deben estar relacionadas con su interacción con otros neurotransmisores mediante fenómenos de cotransmisión, como el GABA y la dopamina (Jessell, 1978; Somogyi, 1982). La presencia de SP y su receptor NK1 en la amígdala sugiere su participación en el comportamiento emocional y la respuesta neuroquímica al estrés (De Felipe, 1984). Existen datos que asocian efectos neuroprotectores a la SP a dosis fisiológicas (Amadoro, 2007; Lallemand, 2003), así

como efectos neurotróficos en cuanto a la regeneración neuronal tras un daño agudo (Kim, 2015; Park, 2007). También se le atribuye participación en la formación del SNC durante la embriogénesis (De Felipe, 1995).

Es importante mencionar su implicación en la “**inflamación neurogénica**”, en la que ha demostrado ser el principal neurotransmisor. Ésta consiste en un fenómeno de vasodilatación, aumento de la permeabilidad microvascular, dolor, extravasación de proteínas y edema tisular asociado a la liberación de neuropéptidos. Se cree que es consecuencia de un reflejo axoniano que tiene lugar en las terminaciones de las neuronas sensoriales como consecuencia de la estimulación eléctrica, mecánica y química de las fibras C de dichas terminaciones. Aunque en esta conexión se ha postulado la intervención de diferentes neurotransmisores (acetilcolina, noradrenalina, bradiquinina, histamina, serotonina o prostaglandinas), actualmente existe evidencia para afirmar que la SP es el principal mediador de este tipo de respuesta inflamatoria tanto a nivel del SNC como periférico (Lembeck y Holzer, 1979; Pernow, 1985). La SP, a nivel del endotelio vascular, produce vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, extravasación plasmática y aumento de la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, facilitando por medio de éstas la migración transendotelial e infiltración de los neutrófilos en el foco inflamatorio (Nakagawa, 1995; Quinlan, 1998). También presenta actividad neuroinmunorreguladora sobre la inmunidad celular y humoral, estimulando la proliferación de células T (Payan, 1983), diferenciación de células B, degranulación de mastocitos y diapédesis leucocitaria (Krause, 1992; McGillis, 1990). La SP liberada por los astrocitos activa diferentes moduladores transcripcionales, entre los que destaca el factor de transcripción NF-kappaB, con un papel muy importante en la regulación de la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-8 y que además participa en la regulación de la apoptosis (Fiebich, 2000; Lieb,

1997). La SP también induce un aumento en la expresión de IL-2 por las células T (Calvo, 1992; Rameshwar, 1993), e IL-1, IL-6 y TNF- por astrocitos (Gitter, 1994) y monocitos (Lotz, 1988). Además, la disponibilidad de modelos animales *knockout* para SP/NKA ha permitido comprobar que la expresión de estas TK en las neuronas sensoriales y células hematopoyéticas es necesaria para el desarrollo de inflamación en la vía aérea tras la formación del complejo antígeno-anticuerpo (Chavolla-Calderon, 2003). Por todo esto la inflamación neurogénica representa uno de los ejemplos más notables del papel que la SP desempeña en procesos fisiopatológicos (Severini, 2002).

La SP se encuentra íntimamente relacionada con la **epilepsia**, ha sido implicada en la generación de status epiléptico (Zachrisson, 1998), y disminuye el umbral de inicio de la actividad convulsiva. Spantide II, un antagonista del receptor de la SP, es capaz de suprimir la actividad electroencefalográfica y prevenir el desarrollo de nuevas crisis en modelo experimental animal (Liu, 1999). Estos datos demuestran el papel proconvulsivante de la SP y de su gen *TAC-1*. Recientemente se ha demostrado un aumento en la expresión tanto de SP como del receptor NK1 en las neuronas y células gliales del hipocampo de enfermos con esclerosis mesial temporal (Blanco, 2012). La adición de un bloqueante del receptor NK1 al tratamiento actual con antiepilépticos como la lamotrigina, puede ser beneficioso en pacientes que sufren epilepsia refractaria (Kalinichev, 2010; Muñoz y Coveñas, 2014).

Los pacientes afectos de esclerosis lateral amiotrófica presentan un patrón de células que expresan SP diferente en comparación con sujetos controles (Gillberg, 1982; Matsuishi, 1999). En la enfermedad de Parkinson, numerosos trabajos han establecido una relación entre el debut de la enfermedad con la degeneración de diferentes tipos neuronas que contienen SP en la sustancia nigra, ganglios basales y áreas circundantes (Cui, 2008; Gai, 1991; Mauborgne, Javoy- Agid, 1983). También se ha relacionado la

SP en la génesis de la degeneración espinocerebelosa o ataxia espinocerebelar tipo III (Matsuishi, 1996). En la enfermedad de Huntington se ha descrito la pérdida de neuronas SP-positivas a nivel del cuerpo estriado y otras regiones de los ganglios basales (Richfield, 2002). Incluso se ha establecido una correlación entre la severidad de la enfermedad y un gradiente en la pérdida de inmunorreactividad de la SP en el cuerpo estriado (Ferrante, 1986). Los pacientes afectados de enfermedad de Alzheimer presentan una menor expresión de SP en diferentes regiones cerebrales (Beal y Mazurek, 1987; Kowall, 1993). En cambio, los niveles aumentados de SP en LCR se correlacionan con un debut clínico tardío (mayores de 65 años) (Rosler, 2001). Recientemente la SP ha demostrado revertir la neurotoxicidad mediada por el amiloide beta (Flashner, 2011; Pieri, 2010).

En la **piel**, la SP induce liberación de histamina produciendo eritema, erupción y picor. Este efecto se bloquea con la administración de antihistamínicos (Hagermark, 1978). Un reciente estudio ha puesto de manifiesto la capacidad de la SP, aplicada de forma tópica, para acelerar la cicatrización de heridas cutáneas. Esta mejoría se produce mediante la modulación de citoquinas (IL-10, TNF- ) y factores de crecimiento (TGF- , factor de crecimiento vascular endotelial), que provocan en la herida una más temprana infiltración leucocitaria, proliferación de fibroblastos, angiogénesis, depósito de colágeno y reepitelización. Basado en estos hallazgos los autores sugieren que la SP tópica podría ser de utilidad para tratar las úlceras de los enfermos diabéticos (Kant, 2013). También se ha establecido una relación entre los niveles elevados de SP y expresión de receptores NK1 en la piel de pacientes afectados de mastocitosis (Maintz, 2011).

La SP se considera uno de los principales neurotransmisores implicados en la **transmisión de la sensación dolorosa** y su posterior elaboración en el SNC (Henry,

1993; Radhakrishnan y Henry, 1995). La SP se sintetiza a nivel periférico en las fibras nerviosas nociceptivas de pequeño diámetro para, tras una estimulación periférica intensa, ser liberada en las astas dorsales de la médula, donde activan los receptores NK1 de las vías de transmisión del dolor hacia el SNC (Severini, 2002). En 1977, Jessel & Iversen demostraron que un análogo de la metionina-enkefalina bloqueaba la liberación de SP en preparaciones del núcleo del trigémino, región rica en terminaciones dolorosas y neuronas que contienen SP, y este efecto, a su vez, era antagonizado por naloxona (Jessel & Iversen, 1977). Hoy sabemos que la SP no sólo regula la excitabilidad de las neuronas nociceptivas del asta dorsal, sino que también está involucrada en el proceso de integración del dolor a nivel central y en la generación del estrés y ansiedad que éste desencadena (DeVane, 2001). La primera generación de antagonistas no peptídicos de los receptores NK1 son potentes inhibidores de la excitación del asta dorsal de la médula (Radhakrishnan y Henry, 1991). La molécula L-733,060, antagonista no peptídico, tiene buena penetrancia en el SNC y su acción es de larga duración (Rupniak, 1996).

En el **aparato respiratorio** en 1977 se identificó por primera vez SP en fibras nerviosas del músculo, tejido conectivo y epitelio traqueobronquial (Nilsson, 1977). La SP es un broncoconstrictor muy potente y además tiene un gran efecto vasodilatador sobre los vasos de la vía aérea, induce la secreción de moco y regula el mecanismo de aclaramiento mucociliar (Chapman, 1998). La expresión pulmonar del receptor NK1 es cuatro veces mayor cuando el pulmón está infectado por virus respiratorio sincitial (VRS). La inhibición selectiva del receptor NK1 suprime la inflamación neurogénica en las vías respiratorias intrapulmonares infectadas por VRS. La profilaxis con anticuerpo monoclonal contra VRS, inhibe la inflamación neurogénica y el aumento del receptor NK1 que se produce en la infección por dicho virus. Así, el uso de antagonistas del

receptor NK1 para el tratamiento de la bronquiolitis por VRS, probablemente podría ofrecer un tratamiento específico para esta enfermedad (Muñoz, 2011). Son muchas las sustancias que inducen la liberación de NP desde las terminaciones nerviosas sensoriales pulmonares, entre ellas los alérgenos, la histamina, prostaglandinas y leucotrienos. Los pacientes con asma presentan un aumento en la expresión tanto de SP como de receptores NK1 en el árbol bronquial. La SP parece jugar un papel importante en el desarrollo de hiperreactividad bronquial, inflamación de la vía aérea y tos (Advenier, 1999; Ellis y Undem, 1994). Mientras que el efecto en la hiperreactividad bronquial está mediado sobre todo por el receptor NK2, la rotura microvascular con extravasación de plasma y formación de edema están mediados por el receptor NK1 (Grant, 2002; Maggi, 1995). La inflamación neurogénica inducida por la SP también participa en otras patologías respiratorias, como son la tos no productiva, infecciones respiratorias por virus, rinitis alérgicas y sarcoidosis (O'Connor, 2004).

A nivel **cardiovascular**, la SP es uno de los vasodilatadores más potentes conocidos (su acción vasodilatadora es 100 veces mayor que la de las bradicininas). Su administración ejerce un efecto hipotensor muy potente acompañado de taquicardia, comprobado tanto en estudios de animales como humanos (Erspamer, 1981; Evans, 1988). Experimentalmente, la administración intravenosa de eledoisina, agonista de la SP, produce hipertensión intracraneal, aumento de la frecuencia respiratoria y vasodilatación cutánea (Broccardo, 1995). Este efecto vasodilatador sólo puede obtenerse si el endotelio está intacto (D'Orleans-Juste, 1985; Regoli, 1987), por lo que se piensa que las TK actúan promoviendo la liberación a nivel endotelial de factores endógenos (prostaciclina, óxido nítrico, factor relajante derivado del endotelio) que reducen el tono de la musculatura lisa arterial. También se ha encontrado SP en terminaciones nerviosas sensoriales que rodean a los vasos sanguíneos de diferentes

localizaciones anatómicas, por medio de las cuales median la llamada vasodilatación neurogénica (Furness, 1982). En modelos experimentales de miocarditis vírica, se ha visto que el empleo de antagonistas de los receptores NK1 podrían reducir la cardiomegalia, necrosis, inflamación, y apoptosis de cardiomiocitos que se dan en esta patología (Robinson, 2009).

La SP participa en múltiples procesos relacionados con el **sistema endocrino**. La SP se ha relacionado con los cambios producidos por el envejecimiento a nivel del eje hipotálamo-hipofisario (Yuan, 2005). En los últimos años se ha puesto de manifiesto el papel tan relevante que desempeña la SP en la regulación neuroendocrina de la reproducción (Lasaga y Debeljuk, 2011). Los cambios en la concentración de la SP plasmática durante el ciclo menstrual sugieren que ésta desempeña un papel importante en la regulación de la ovulación (Kerdelhue, 2006; Kerdelhue, 2000), y también parece regular la secreción de prolactina (Skinner, 2009). Se ha comprobado la existencia de SP tanto en las células de Leydig testiculares de ratas (Ortega, 2006) como en células granulosas del ovario de estos roedores, y se ha sugerido su papel en la implantación (Pintado, 2003). Tanto SP como NKA aumentan la motilidad de los espermatozoides humanos de forma proporcional a su concentración, ya que éstos expresan tanto receptores NK1 como NK2 (Ravina, 2007).

Desde hace décadas se conoce el papel tan importante que las TK ejercen en el **tracto gastrointestinal**. Los tres tipos de RTK se expresan en las neuronas entéricas, músculo liso, células epiteliales, células del sistema inmune y vasos sanguíneos. Tanto la SP como otras TK están implicadas en funciones de secreción de fluidos y electrolitos, motilidad intestinal, vascularización y función inmunitaria. Se habla incluso de la regulación taquicinérgica intestinal y del potencial papel de los RTK como dianas terapéuticas (Furness y Costa, 1987; Holzer y Holzer-Petsche, 1997a, 1997b). A nivel

gastrointestinal, la SP regula la contractilidad de la musculatura lisa, el transporte epitelial de iones, la permeabilidad vascular y la actividad inmunológica local. Se ha encontrado un aumento en los niveles de SP y expresión del receptor NK1 en el recto y colon de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, presentando este aumento una correlación con la actividad de la enfermedad (O'Connor, 2004).

La SP desempeña un papel fundamental en la regulación de la **afectividad emocional** y respuesta neuroquímica al estrés, por lo que alteraciones en este complejo SP/NK1 receptor estarían involucrados en la patogenia de la depresión y otros trastornos psiquiátricos (Kramer, 1998; Pantaleo, 2010). En los últimos años diversos trabajos han puesto de manifiesto la relación de la SP en estos trastornos (Herpfer y Lieb, 2003; Mantyh, 2002). Se ha comprobado que los sujetos con mayor ansiedad presentan mayores niveles plasmáticos de SP (Schedlowski, 1995; Weiss, 1996; Bondy, 2003). También se han descrito niveles aumentados de SP en LCR de sujetos con depresión, sintomatología esquizofrénica (Rimon, 1984) y fibromialgia, trastorno relacionado con la depresión (Russell, 1994; Vaeroy, 1988). Se ha confirmado la presencia de SP en el hipotálamo y amígdala, estructuras del sistema límbico involucradas en la regulación del comportamiento emocional (DeVane, 2001). La infusión de SP durante el sueño ha demostrado asociar un peor estado de ánimo al despertar y una disminución en la calidad del sueño (Lieb, 2002). Los estudios realizados en este área, se basaron en la presencia de receptores NK1 en las regiones cerebrales relacionadas con el comportamiento emocional. Destacan los ensayos realizados por Kramer (1998) y Rupniak et al (2000), donde demuestran la capacidad ansiolítica ciertos antagonistas de los receptores NK1. Kramer et al realizaron un ensayo clínico a doble ciego comparando el MK-869 (aprepitant) con la paroxetina y placebo,

observando igual eficacia como antidepresivo que la paroxetina y con efectos secundarios similares al placebo (Kramer, 1998).

La génesis y progresión de los **tumores** están íntimamente relacionadas con el SI, de manera que las células inmunes pueden actuar tratando de detener la génesis de tumores o facilitando la progresión de los mismos a distintos niveles. Este planteamiento unido a una serie de datos experimentales ha llevado a algunos autores a formular la hipótesis de que el SNC podría ser capaz de monitorizar y modular la formación de tumores a través de interacciones del eje neuro-inmuno-endocrino, (Gidron, 2005; Mravec, 2006), en el que como sabemos la SP desempeña un papel fundamental. Una de las acciones de la SP que ha tenido mayores implicaciones en la investigación es su capacidad mitogénica, comprobada en diferentes tipos celulares sanos: células del tejido conectivo (Nilsson, 1985), sinoviocitos (Lotz, 1987), fibroblastos (Ziche, 1990) y linfocitos (Payan, 1983). También se ha comprobado su capacidad para estimular la neovascularización a través de la inducción de proliferación endotelial (Ziche, 1990). De hecho, la SP puede considerarse como un mitógeno cuasi-universal. Ya en la década de los 80 se identificó la presencia de SP y otros NP en tumores primarios del SNC de humanos (Allen, 1985). Una década después, Hennig et al no sólo demostraron la existencia de receptores NK1 en células tumorales de astrocitoma, glioblastoma, carcinoma medular de tiroides, cáncer de mama y ganglioneuroblastoma, sino que además observaron que en la mayoría de estos tumores este receptor se expresaba tanto en los vasos sanguíneos intra como peritumorales. Este hallazgo planteó la hipótesis de que la SP participa en la progresión y crecimiento de las células tumorales a través de su relación con los vasos sanguíneos de la vecindad, actuando de forma autocrina y paracrina (Hennig, 1995). En 1996, Luo et al comprobaron in vitro por primera vez que concentraciones fisiológicas de SP inducen

mitogénesis a través del receptor NK1 en una línea celular de astrocitoma humano. Demostraron que esta respuesta mitogénica estaba mediada por la incorporación de una [3H]timidina al ADN. Este proceso está relacionado con la estimulación de la actividad de la tirosincinasa y las cinasas extracelulares reguladas por señal (Erk1 y Erk2) (Luo, 1996). Pocos años después se demostró en un modelo animal, consistente en inyectar células tumorales de astrocitoma humano a ratones atímicos, que el complejo SP-NK1 receptor participa en desarrollo y crecimiento in vivo del tumor (Palma, 2000). Con estos hallazgos se abría un nuevo camino para el empleo de antagonistas de los receptores NK1 como potenciales tratamientos anticancerosos. Ya en la última década, numerosos trabajos, entre los que destacan los realizados por el grupo del Dr. Miguel Muñoz Sáez, han puesto de manifiesto que tanto la SP como su receptor NK1 se expresan en diferentes tipos de células tumorales. En todas las líneas tumorales estudiadas la SP induce la proliferación celular y la mitogénesis, habiéndose demostrado el efecto antitumoral derivado del bloqueo los receptores NK1 con diferentes antagonistas específicos de este receptor. Destacan los estudios llevados a cabo en líneas celulares de retinoblastoma (Muñoz, 2007; Muñoz, 2005), neuroblastoma y glioma (Muñoz, 2004; Muñoz, 2005), leucemia aguda linfoblástica (Muñoz, 2012), melanoma (Muñoz, 2004; Muñoz, 2010), adenocarcinoma gástrico y de colon (Rosso, 2008), cáncer de mama (Bigioni, 2005), laríngeo (Esteban, 2009; Muñoz, 2008) y en cáncer de pulmón (Muñoz, 2012). También se ha estudiado el papel de la SP y su receptor en el tejido tumoral de cáncer de páncreas (Friess, 2003), tumor queratoquístico odontogénico (Gonzalez Moles, 2008) y en el carcinoma oral de células escamosas (Brener, 2009). Por todo esto el bloqueo de los receptores NK1 se ha convertido en una diana terapéutica de creciente interés en los últimos años (Muñoz y Coveñas, 2010, 2011, 2012; Muñoz, 2012; Muñoz y Rosso, 2010; Muñoz, 2010, 2011; Rosso, 2012).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

## 1. HIPÓTESIS

Las TK son una familia de péptidos muy ampliamente distribuída en animales vertebrados e invertebrados. En las últimas décadas numerosos trabajos han puesto de manifiesto la presencia de TK, fundamentalmente la SP y su receptor NK1, en diversos órganos y tejidos de nuestra anatomía. A partir de este descubrimiento se ha postulado su papel etiopatogénico en una gran variedad de fenómenos fisiológicos y patológicos, aumentando el conocimiento que tenemos de dichas condiciones y abriendo el camino al planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas.

Es conocido que la SP se encuentra involucrada en diversas patologías que afectan al SNC, como infecciones, depresión, epilepsia, trastornos del sueño..., entre otros. Se conoce también, que la SP fisiopatológicamente participa de manera principal en procesos de inflamación, inmunidad, neoplasia, embriogénesis, etc.

Actualmente se desconocen los valores “normales”, “basales” o “fisiológicos” de SP en LCR de RN sin patología del SNC, tanto a término como prematuros. Este conocimiento nos aportaría unos valores de referencia fundamentales que nos abriría camino a iniciar el estudio sobre la desviación en dichos valores que encontraríamos en caso de patología, principalmente meningitis/encefalitis, hemorragia, asfixia perinatal, tumores, malformaciones, etc. La disponibilidad de antagonistas selectivos de los receptor NK1, de tipo no peptídico, abre la posibilidad de bloquear los efectos de la SP en la práctica clínica, si se llegara a probar que ésta desempeña un papel relevante en los procesos referidos en el neonato.

Actualmente sólo existe una aproximación a dichos valores “normales”, estudiados en muy escasos pacientes y mediante la técnica de RIA. Este “vacío” es debido principalmente al hándicap que supone para la obtención de las muestras la

realización de una punción lumbar, técnica invasiva y no exenta de potenciales riesgos, en RN que se suponen “sanos”.

Nuestro objetivo sería determinar los valores normales de SP en RN mediante la técnica de ELISA y en una muestra representativa que permita la obtención de valores fiables definitivos a partir de los cuales basar futuras investigaciones. Contamos con la enorme ventaja inicial para la obtención de las muestras de realizar el estudio en un centro de tercer nivel, con la disponibilidad de un elevado número de pacientes que nos permita trabajar con el número de muestras adecuado para nuestros fines. Para salvar el mencionado hándicap, el estudio se ha realizado sobre RN con factores de riesgo para que la indicación de una PL sea éticamente factible, en los que se descarte patología del SNC.

**Así, partiendo de:**

- 1º - La SP es una molécula con características de neurotransmisor, neuromodulador y hormona.
- 2º - La SP se distribuye ampliamente por todo el organismo.
- 3º - La SP esta ampliamente distribuída en el SNC.
- 4º - La SP es el mediador principal de la inflamación neurogénica.

**Consideramos las siguientes hipótesis:**

- 1º- La SP a través de su receptor NK1 interviene en el desarrollo y fisiología normal del sistema nervioso.
- 2º- El sistema SP/receptor NK1 está implicado en del desarrollo del SNC y en diferentes patologías como las causadas por infección, hipoxia-isquemia, hemorragia o inflamación.
- 3º- Los niveles de SP en LCR de RN podrían variar en función de la edad gestacional, edad cronológica y diferentes estados patológicos.

Por tanto y en base a lo anteriormente expuesto, pensamos que los valores de SP en LCR de RN estarían más elevados en las patologías que afectan al SNC como las que

cursan con inflamación; los valores basales con los que cotejarlos quedarían así establecidos con este estudio, constituyendo la base de futuras investigaciones que interrelacionen patología del SNC y SP en el RN.

## **2. OBJETIVO**

Determinar los valores normales o basales de SP en LCR en RN.

# **III. MATERIAL Y MÉTODO**

## **1. MATERIAL.**

### **1.1. MATERIAL FUNGIBLE.**

1. Pipetas serológicas estériles de 1 ml, 5 ml y 10 ml (Becton Dickinson®, Francia).
2. Puntas de pipetas estériles de 1-10  $\mu$ l y 20-200  $\mu$ l (Nunc Brad Products®, Dinamarca).
3. Pipetas Pasteur estériles desechables de 3 ml (Nunc Brad Products®, Dinamarca).
4. Tubos eppendorf de 1,8 ml (Daslab Nirco®).
5. O-Phenantroline (Sigmas Aldrich®)
6. Kits para determinación de SP para Enzimoinmunoanálisis (Cayman®).
7. Agua ultra pura de 1 L (Cayman®).
8. Film transparente (Parafilm® M).

### **1.2. MATERIAL INVENTARIABLE.**

1. Soporte de acero inoxidable (Air Liquide®).
2. Frigorífico (Superser Ecologic®).
3. Congelador de - 80 °C (New Brunswick Scientific Co., Inc. USA).
4. Vortex (Gene 2, Scientific industries ®, U.S.A.).
5. Cronómetro digital (Digital timer®, China).
6. Micropipetas de 10, 100  $\mu$ l y 1 ml (Pipetman, Gilson®).
7. Lavador automático de microplacas de 96 pocillos (Atlantis 2, ASYS Hitech Biochrom Ltd).
8. Lector de placa capaz de medir absorbancia de 405-420 nm TECAN (Spectra classic, Barcelona, España).
9. Cilindro graduado de 500 ml para preparar el buffer de lavado (Cosela S.L).
10. Placa horizontal orbital de placas Orbit 300 (Labnet®).

11. Pipeta multicanal de 200 µl (Durviz®).
12. Centrifugadora refrigerada para eppendorf (5415R eppendorf®).
13. Programa estadístico SSPS versión 19.0.

### **1.3. MATERIAL BIOLÓGICO. Recogida de las muestras.**

Las muestras de LCR fueron obtenidas de forma aleatoria entre pacientes menores de 30 días de vida ingresados en la Unidad de Gestión Clínica de Neonatología del Hospital Universitario Virgen del Rocío que precisaran de la realización de una PL por indicación médica. La PL es un procedimiento obligado según diversos protocolos en RN. Así, su realización está indicada cuando existe fiebre, clínica de sepsis, asfisia perinatal, riesgo de transmisión vertical de determinados gérmenes, convulsiones u otro tipo de clínica neurológica, sospecha de enfermedad metabólica, etc. En esta ocasión, la PL se realizó según indicación clínica, como es lo habitual.

El tamaño muestral necesario se calculó a partir del trabajo publicado por Tam et al (1985), a través de la fórmula para determinar la media de una variable (valor de SP en LCR) en una población asumiendo distribución normal, con una seguridad (1-alfa)=95% y precisión del 5%.

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * S^2}{d^2}$$

Para la citada precisión del 5%, obtenemos que necesitamos un  $n = 31$ .

Se recogieron muestras de LCR de todos los RN que cumplieron los criterios de inclusión en el estudio mediante el procedimiento habitual, a saber: aplicación de parche de crema EMLA como anestésico local en zona lumbar, unos 15 minutos antes de la

realización de la técnica; paciente en decúbito lateral izquierdo, ayudante flexionando al RN en posición fetal ligeramente forzada; asepsia de la zona con clorhexidina acuosa 0,2%, en movimiento espiral de dentro a fuera; aguja para PL tipo Quincke tamaño 22 G para RN > 2500 g y 25 G para < 2500 g; buscando el punto de entrada palpando el espacio interespinoso que queda por debajo de la línea que une las dos crestas ilíacas, que se correspondería con el cuerpo vertebral L4 o el espacio intervertebral L4-L5, puncionando en el primer o segundo espacio intervertebral inmediatamente inferior a esta línea, que correspondería con los espacios L4-L5 o L5-S1, ambos inferiores a la terminación de la médula espinal (en el nivel L3 aproximadamente); se introduce con ángulo de unos 15° en dirección al ombligo y bisel hacia arriba; al notar la resistencia por el paso a través del ligamento amarillo, se retira la guía y se deja gotear (nunca aspirar) hasta obtención de 1 ml de LCR que se introduce en criovial Eppendorf (más 0,5 + 0,5 ml que se introducen en tubos estériles transparentes para estudios rutinarios); colocación de nuevo de la guía y retirada de la aguja; aplicación de apósito estéril.

Las muestras se procesaron en los siguientes 30 minutos. Al criovial Eppendorf se añadió O-Phenantroline, 20 mcl/ml. A continuación se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos y 1500 rpm. Finalmente, alícuotas de 200 mcl del sobrenadante se congelaron a -80° hasta el momento del análisis.

Se recolectaron un total de 116 muestras, y tras aplicar estrictamente los criterios de inclusión y exclusión que se citan a continuación, realizamos el estudio sobre **63 muestras**, número bastante superior a las 31 muestras necesarias calculadas.

Además, todos los cálculos se han realizado por duplicado sobre 2 muestras de cada individuo, lo que nos ofrecerá mayor fiabilidad del método. Por lo tanto, realmente se han analizado 126 muestras de LCR.

**Criterios de inclusión:**

1. RN ingresados en la UGC Neonatología del HUVR que se vean sometidos a la realización de PL por INDICACIÓN MÉDICA.
2. Consentimiento informado firmado por los progenitores.
3. A la extracción, LCR macroscópicamente normal.
4. Citoquímica LCR normal.
5. Tinción de Gram negativa.
6. Cultivo LCR negativo.
7. Edad inferior a 30 días.

Los valores citoquímicos de LCR serán considerados normales según lo publicado por Sarff et al (The Journal of Pediatrics 1976) en relación a RNT, y por Rodríguez et al (The Journal of Pediatrics 1990) para los RNPT.

**Criterios de exclusión:**

1. No obtención del consentimiento por parte de los progenitores.
2. LCR macroscópicamente turbio o purulento a la extracción.
3. Citoquímica LCR alterada.
4. Tinción de Gram positiva.
5. Cultivo LCR positivo.
6. Edad superior a 30 días.

7. Signos de asfixia perinatal moderada-severa con pH de 7 o menos, o déficit de base de 16 mmol/L o más, acompañados de signos de encefalopatía moderada-severa.
8. Crisis convulsiva.
9. Malformaciones del SNC: espina bífida, Dandy Walker, Arnold Chiari, etc

## **2. MÉTODO.**

### **2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.**

Estudio observacional descriptivo.

### **2.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO. NÚMERO DE MUESTRAS.**

Se incluyeron todos los RN ingresados en la UGC Neonatología del HUVR que se vieran sometidos a la realización de PL por indicación médica entre febrero de 2009 y enero de 2011 (2 años), y que cumplieran el resto de criterios de inclusión. Finalmente se incluyeron en el estudio un total de 63 muestras.

### **2.3. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN.**

Estudio sujeto a los principios adoptados por la 18ª Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964) y posteriores revisiones. Se han seguido las normas de Buena Práctica Clínica dictadas por la Conferencia Internacional de Armonización de Directrices sobre Buena Práctica Clínica y los requisitos de las Autoridades Sanitarias Españolas establecidos en el Real Decreto 711/2002 de 19 de Julio. Se puso en conocimiento del Comité de Ética de la Universidad de Sevilla, enviándose copia del Proyecto de Tesis. El consentimiento informado de los sujetos o representantes legales fueron obtenidos, tras haber sido informados tanto por escrito como oralmente de los objetivos del

estudio, procedimientos a seguir, derechos y responsabilidades. Los sujetos del estudio se identificaron mediante código único de manera confidencial. Se ha cumplido lo estipulado por la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal. (Ver Anexo: Consentimiento informado)

## **2.4. ENZIMOINMUNOANÁLISIS (ELISA)**

### **2.4.1. CONTENIDO DEL KIT DE ELISA PARA DETERMINACIÓN DE SP**

- 1 vial para 100 determinaciones (dtn) de antisuero de SP.
- 1 vial para 100 determinaciones de SP unida a acetilcolinesterasa.
- 1 vial de SP en polvo para la curva estándar.
- 2 viales de 10 ml de buffer para ELISA para concentración de 10X.
- 1 vial de 5 ml de buffer de lavado de 400X.
- 1 vial de 3 ml de Tween 20.
- Placa de 96 pocillos cubiertos de anticuerpos Ig G contra conejo creado en ratón.
- 1 cubre de placa de 96 pocillos.
- 3 viales para 100 dtn de Reactivo Ellman's (sustrato de la acetilcolinesterasa).

### **2.4.2. DESCRIPCIÓN DEL ENZIMOINMUNOANÁLISIS DE COMPETICIÓN PARA LA SP**

Este ensayo está basado en un mecanismo de competición entre la SP libre y la SP marcada o conjugada con acetilcolinesterasa (SP AChE). Ambas compiten por el sitio de unión de los anticuerpos específicos contra la SP de conejo que se encuentran en los 96 pocillos. Mientras la concentración de SP conjugada se mantiene constante, la concentración de SP libre varia, la cantidad de SP conjugada que es capaz de unirse al antisuero de conejo, será inversamente proporcional a la concentración de SP libre que haya en el pocillo. El complejo antisuero de conejo-SP se une a los anticuerpos

monoclonales de conejo hecho en ratón que se encuentran unido al fondo del pocillo. La placa es lavada para remover los reactivos no unidos y se añade el reactivo Ellman's (el cual contiene el sustrato de la acetilcolinesterasa) al pocillo. El producto de esta reacción enzimática emite un color amarillo a una lectura de absorbancia de aproximadamente de 412 nm determinado espectrofotométricamente, la cuál es proporcional a la cantidad de SP conjugada con acetilcolinesterasa unida al pocillo e inversamente proporcional a la cantidad de SP libre presente en el pocillo (Figura 25).

$$\text{Absorbancia} = \text{SP conjugada con acetilcolinesterasa unida} = 1 / \text{SP libre}$$

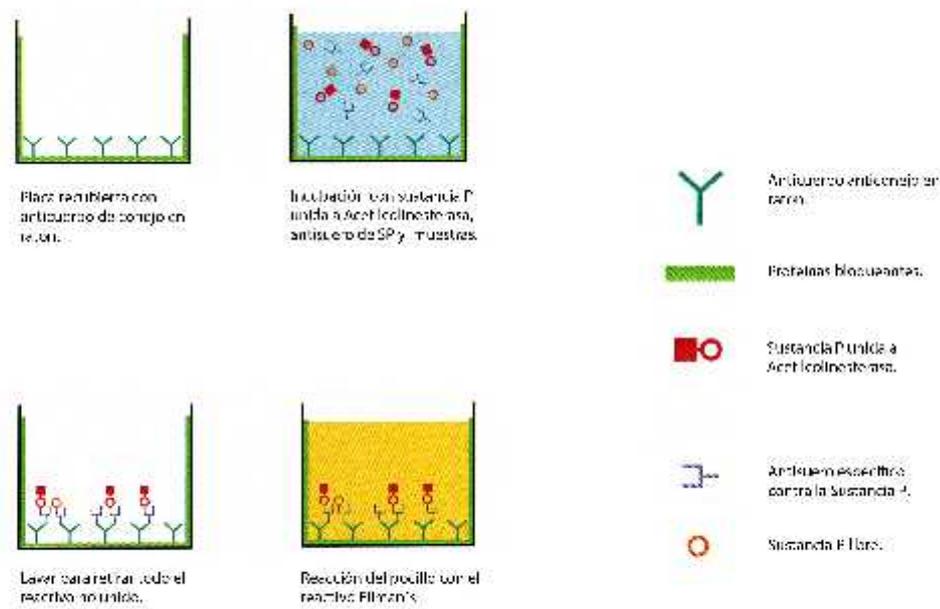


Figura 25. Descripción del ELISA competitivo para SP

### 2.4.3. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

#### **Preparación de la solución Buffer del ELISA.**

Diluir todo el contenido del vial del Buffer para conseguir una dilución a concentración 10X, añadiendo a dicho vial, 90 ml de agua ultrapura, homogenizar el vial y evitar que precipiten sales en el fondo del mismo.

### Preparación del Buffer de lavado.

Diluir el vial de 5 ml de lavado a concentración 400X, hasta un total de 2 litros con agua ultrapura y añadir 1 ml de Tween 20.

### Preparación del reactivo de Ellman.

Se reconstituye inmediatamente antes de su uso. Añadir 20 ml de agua ultrapura al vial del reactivo, cantidad suficiente para los 96 pocillos.

### Preparación curva de SP estándar.

Reconstituir la SP estándar con 2 ml de Buffer para ELISA. La concentración de esta disolución será de 5 ng/ml. Conservar esta solución a 4°C y permanecerá estable durante 6 semanas. Para preparar la curva estándar hay que coger 8 tubos limpios y numerarlos del 1 al 8. Alicuotar 900 µl del buffer de ELISA para el tubo 1 y 500 µl para los tubos del 2 al 8. Transferir 100 µl del tubo matriz o madre al tubo 1 y mezclar enérgicamente, diluir seriadamente el estándar, coger 500 µl del tubo 1 y añadirlo al tubo 2 mezclar enérgicamente y repetir de nuevo el proceso cogiendo 500 µl del tubo 2 y añadirlo al tubo 3, mezclar enérgicamente y repetir este proceso hasta el tubo 8 (último de la curva estándar) (Figura 26).

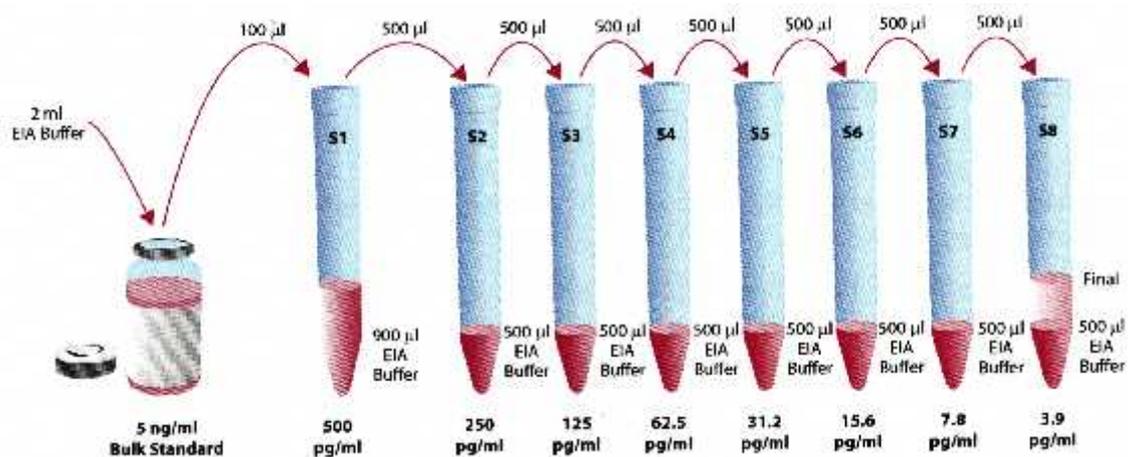


Figura 26: Esquema de curva estándar de preparación de ELISA

### Preparación de la SP conjugada con acetilcolinesterasa.

Reconstituir con 6 ml de buffer para ELISA para placas de 96 pocillos.

### Preparación del antisuero SP para ELISA.

Reconstituir con 6 ml de buffer para ELISA para placas de 96 pocillos

### Reconstituir las muestras con buffer para ELISA.

Reconstituir con buffer para ELISA con un volumen igual al volumen de la muestra original, es decir, con 100 µl y vortear enérgicamente para homogenizar las muestras antes del montaje de la placa.

#### 2.4.4. DESCRIPCIÓN DEL MONTAJE DE LA PLACA

Cada placa debe contener dos pocillos con blanco (blank), dos pocillos de unión no específica (NSB), dos pocillos de máxima unión (B0), uno de total actividad (TA) y cada puntos de la curva estándar por duplicado (Std), dos controles internos, control 1 (Ctrl 1) correspondiente al valor de SP del estándar 1 y el control 2 corresponde al valor de SP del estándar 3 según indicaciones del fabricante. Cada muestra analizada debe ser realizada doblemente y diluida al medio con el buffer del ensayo (Tabla 17).

ENSAYO		Substance										
modelo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Std01	Std01	Muestra								
H	Blank	Std02	Std02	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
I	NSB	Std03	Std03	Muestra								
D	NSB	Std04	Std04	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
F	B0	Std05	Std05	3	3	7	7	11	11	15	15	Ctrl
G	B0	Std06	Std06	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:1
G	B0	Std07	Std07	Muestra	Ctrl2							
H	TA	Std08	Std08	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:1

Tabla 17: Montaje de la placa

#### 2.4.5. ADICIÓN DE LOS REACTIVOS Y DE LAS MUESTRAS A LA PLACA

Añadir 100 µl del buffer del ensayo a los pocillos de unión no específica (NSB). Añadir 50 µl del mismo buffer a los pocillos de máxima unión (Bo). Añadir 50 µl del tubo 8 (el punto de más baja concentración del estándar) comenzando por abajo de la placa y por duplicado (S8), según tabla del montaje mas arriba expuesto y repetir el proceso con cada punto del estándar. Usar la misma punta de pipeta para alicuotar todos los puntos del estándar en la placa, asegurándose en cada punto una adecuada calibración de la pipeta. Añadir 50 µl de cada muestra a analizar por pocillo realizándolo por duplicado y cada muestra debe ser ensayada con un mínimo de una dilución y cada dilución debe ser ensayada por duplicado. Añadir 50 µl de SP conjugada con colinesterasa a cada pocillo excepto al de total actividad (TA) y a los pocillos blancos (Blk). Añadir 50 µl de antisuero de SP excepto al de total actividad (TA), a los de la unión no específica (NSB) y a los blancos (Blk).

POCILLOS	ELISA BUTTER	MUESTRA ESTÁNDAR	TRACER	ANTICUERPO
BLK	----	----	----	----
TA	----	----	5µl en último paso	----
NSB	100µl	----	50µl	----
B0	50µl	----	50µl	50µl
MUESTRA STANDARD	----	50µl	50µl	50µl

Tabla 18: Preparación de la placa. Adición de los reactivos y de las muestras a la placa.

Cubrir la placa con tapa de plástico e incubar a 4°C sobre una placa orbital toda la noche. Posteriormente vaciar los pocillos y enjuagarlos 5 veces con el buffer de

lavado. Luego reconstituir el reactivo Ellman's inmediatamente antes de su uso con 20 ml de agua ultrapura y añadir 200 µl de este reactivo a cada pocillo con la pipeta multicanal (como se muestra en la figura 37) y 5 µl de SP conjugada al pocillo de total actividad (TA). Cubrir nuevamente la placa con el film de plástico e incubar en la oscuridad sobre una placa orbital durante 90-120 minutos y leer la absorbancia a 405-420 nm con un espectrofotómetro. La reacción será óptima cuando la absorbancia de los pocillos de máxima unión (Bo) menos la absorbancia del blanco (Blank) esté entre 0,3-1 UA (unidades de absorbancia) y en ese momento debe ser leída.

Posteriormente los datos son analizados mediante una hoja de cálculo disponible por la casa comercial Cayman según el montaje de la tabla 17 (Tabla 17).

### **3. RECOGIDA DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CLÍNICOS**

Se realizó la recogida de los datos epidemiológicos y clínicos de forma retrospectiva utilizando el sistema informático del hospital (SIDCA). Se recogieron y analizaron las siguientes variables:

- Sexo
- Edad gestacional
- Edad (días)
- PCR (mg/L)
- Clínica inicial
- Diagnóstico final
- Valor SP (pg/ml)

## 4. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos han sido almacenados en la base de datos a partir del programa estadístico IBM SSPS Statistics 19 para Windows y se ha realizado el siguiente análisis en la Unidad de Estadística con el asesoramiento metodológico de la Unidad Docente correspondiente del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

Se ha realizado un análisis descriptivo y analítico de los valores de SP en las muestras obtenidas. Se realizó prueba de rachas para confirmar aleatoriedad de la muestra. Las variables cuantitativas se han representado mediante medias, desviaciones típicas, medianas, rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) y rango (mínimo; máximo). En el caso de las variables categóricas hemos utilizado frecuencias relativas y porcentajes para su representación. Para estudiar si las variables cuantitativas seguían una distribución normal se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov ( $n > 50$ ).

Para facilitar el análisis de los datos, se ha realizado su tabulación y recogida de los mismos en base de datos informatizada. Se realizó el cálculo de las tablas y gráficas de percentiles de los niveles de SP en LCR en función de los datos epidemiológicos y clínicos. Se obtuvieron los Intervalos de Confianza para la media al 95% (IC 95%).

Para observar posible asociación entre variables, se realizaron nubes de puntos y se cuantificaron asociaciones con el coeficiente de correlación de Pearson.

Realizamos representaciones gráficas de las variables del estudio a través de diagramas de barras, diagrama de cajas e histogramas. Se realizaron gráficos de nubes de puntos para observar la tendencia de las posibles asociaciones. Se consideró el dintel de significación  $p < 0.05$ .

# **IV. RESULTADOS**

Se han analizado un total de 63 muestras procedentes de 63 pacientes diferentes, siguiendo los criterios de inclusión y exclusión previamente descritos. Asumimos la aleatoriedad de la muestra mediante prueba de rachas.

Las características de estos sujetos se describen a continuación:

Con respecto a la edad, se han recogido muestras con edades comprendidas entre 0 y 30 días (Figura 27).

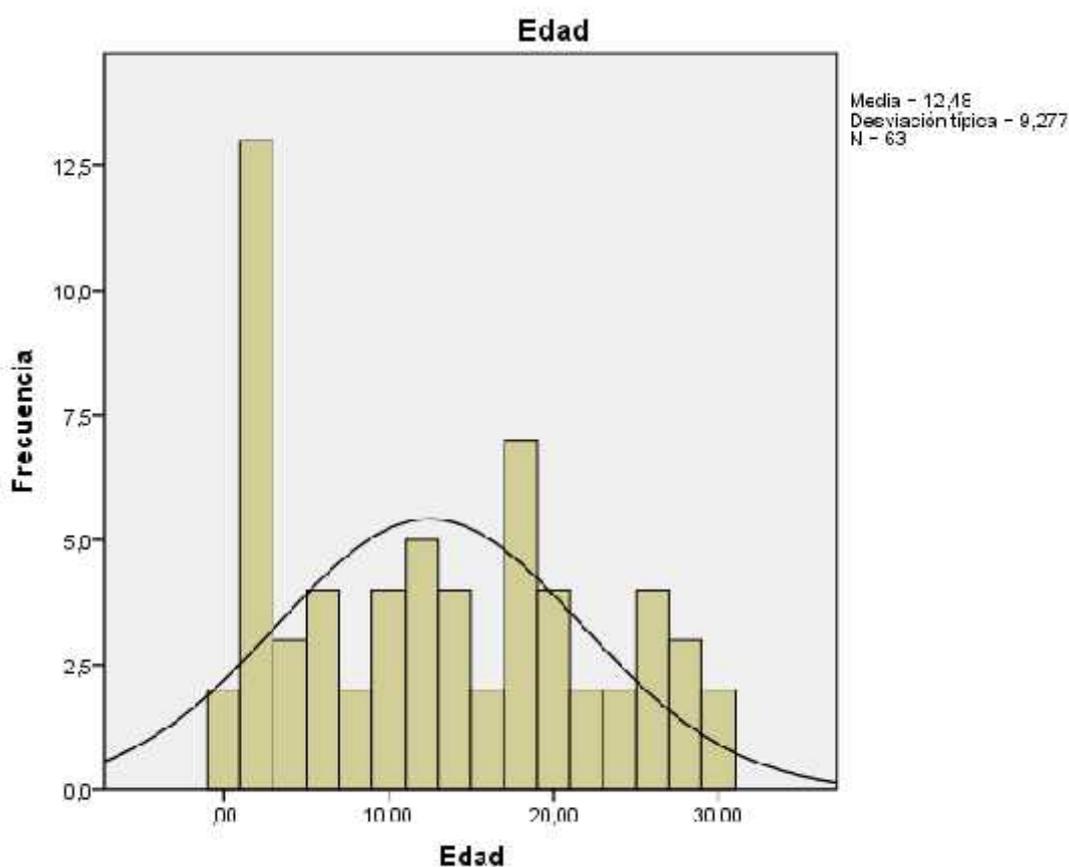


Figura27: Edad.

La media fue de 12,47 días (desviación típica de 9,27), con un p25 de 3 días, p50 de 12 días y p75 de 20 días.

Con respecto a la edad gestacional, 47 de los 63 pacientes eran RNT ( > 37 semanas EG) y 16 RNPT (< 37 semanas EG). De estos últimos, 9 eran prematuros

tardíos (34-36 semanas EG), 2 se situaban en EG comprendidas entre 32 y 33 semanas, y 5 sujetos fueron grandes prematuros (28-31 semanas EG) (Figura 28).

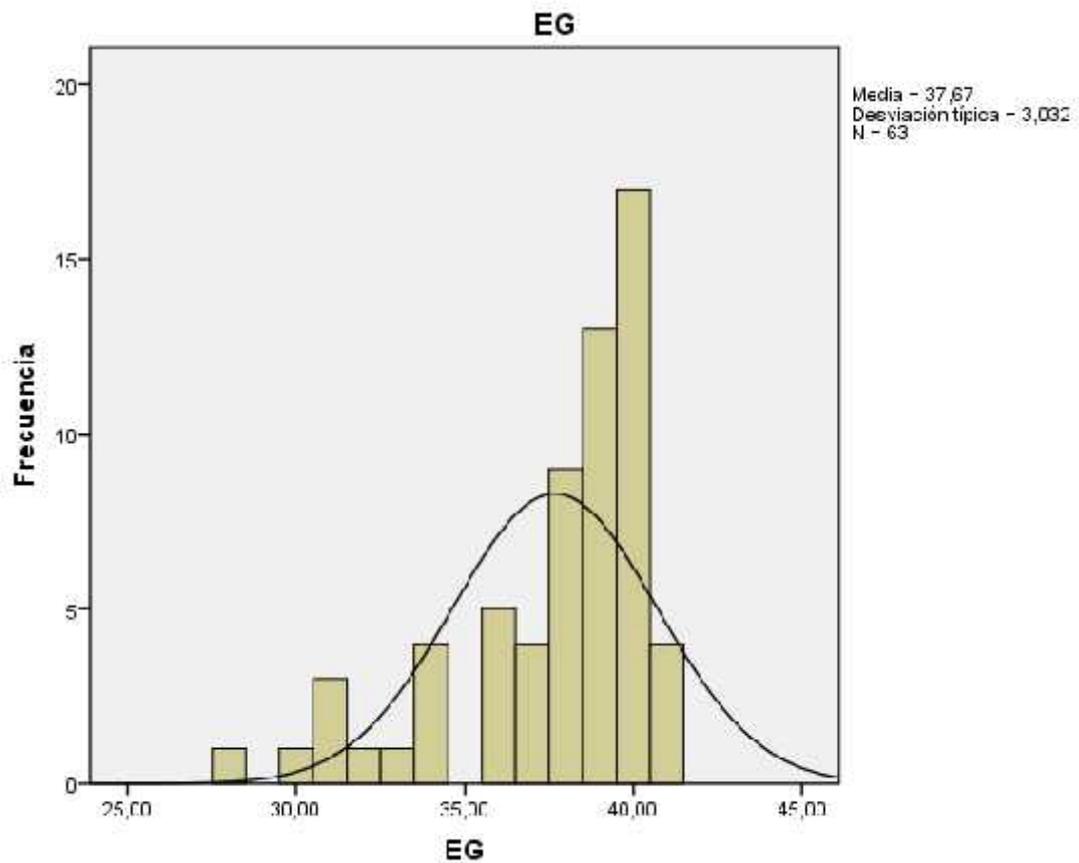


Figura 28: EG.

La media de EG obtenida fue de 37,66 semanas (que corresponde aproximadamente a 37 semanas y 4 días), con una desviación típica de 3 semanas, mínimo de 28 y máximo de 41. El p25 se situaba en 36 semanas, p50 en 39 y p75 en 40 semanas (Figura).

La mayoría de los sujetos del estudio eran hombres (65,08% hombres y 34,92% mujeres) (Figura 29).

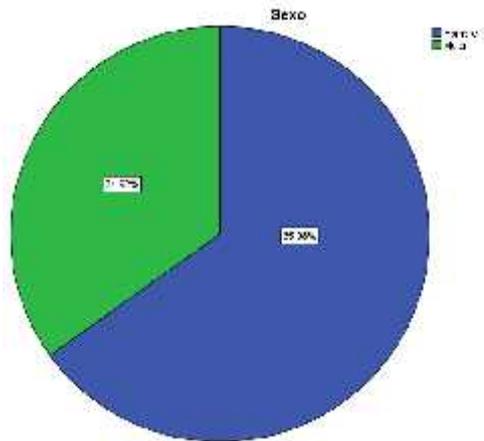


Figura 29: Sexo

El motivo médico para la realización de la PL a la hora de la obtención de la muestra se resume como sigue (Figura 30 y Tabla 19):

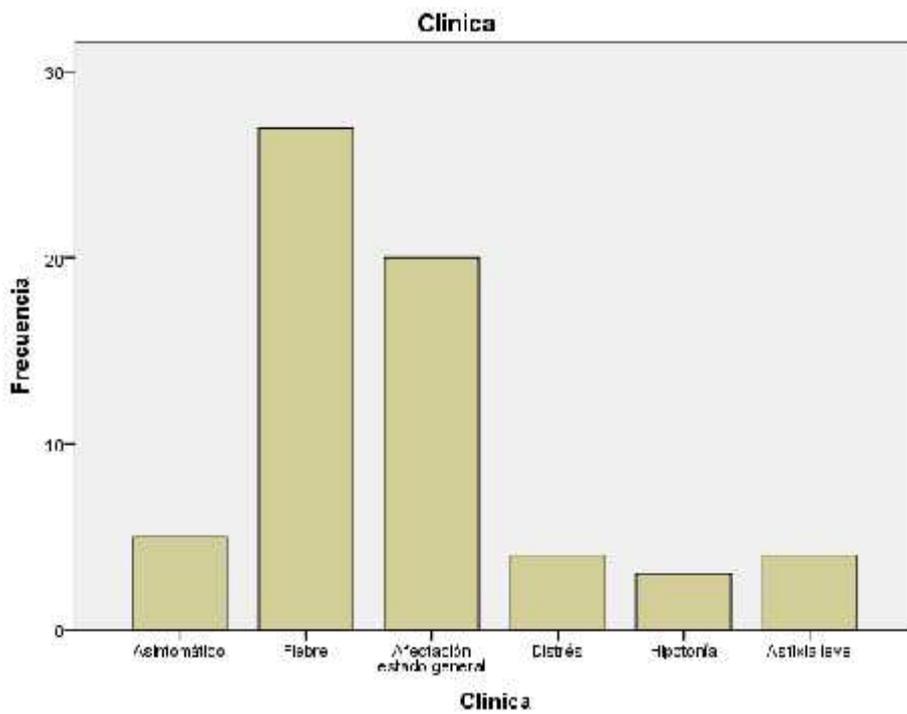


Figura 30: Clínica inicial

### Clínica

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Asintomático	5	7,9	7,9	7,9
	Fiebre	27	42,9	42,9	50,8
	Afectación estado general	20	31,7	31,7	82,5
	Distrés	4	6,3	6,3	88,9
	Hipotonía	3	4,8	4,8	93,7
	Asfixia leve	4	6,3	6,3	100,0
	Total	63	100,0	100,0	

Tabla 19: Clínica inicial

Así, 5 RN se encontraban asintomáticos y la PL se realizó por los siguientes motivos: en 2 casos por ascenso de PCR, uno por sífilis materna, otro por sospecha de corioamnionitis y crecimiento de *Listeria monocytogenes* en cultivo de la placenta, y en un último caso por reacción exagerada a estímulos que finalmente se diagnosticó de hiperplexia. La mayoría de los sujetos estudiados (27 RN) presentaban fiebre (temperatura axilar  $38^{\circ}\text{C}$ ), 20 afectación del estado general sin fiebre, 4 distrés respiratorio sin fiebre ni afectación del estado general, 3 hipotonía sin otra sintomatología, y en 4 la PL se realizó por cumplir criterios clínicos y gasométricos de asfixia leve.

Se recogieron también datos de los valores plasmáticos de PCR en el momento de la PL, que se muestran en el siguiente gráfico (Figura 31):

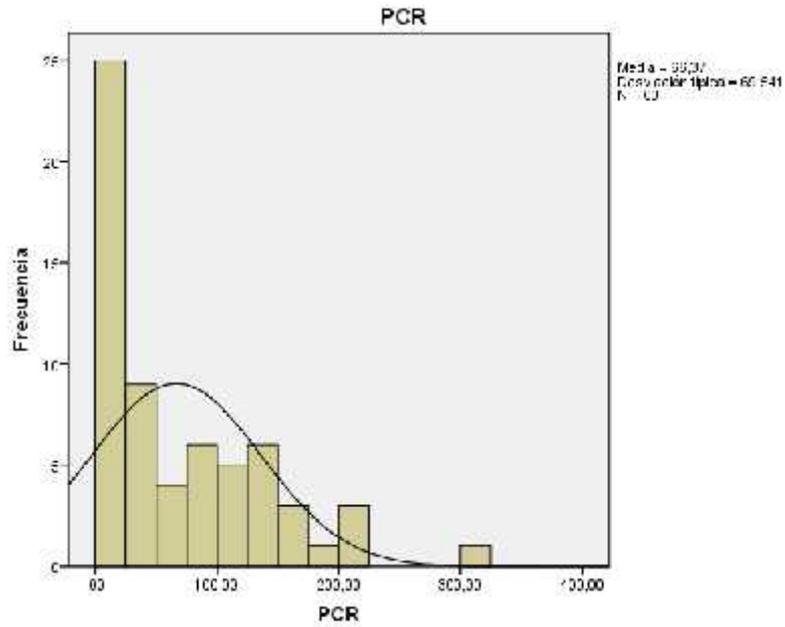


Figura 31: Valores de PCR

Como se puede apreciar, la PCR media obtenida fue de 66,36 mg/L, con un valor máximo de 305 mg/L y un mínimo de 0.

Una vez descritas las características de la población de estudio a través de las variables EG, edad en días, sexo, clínica y PCR, pasaremos a describir los resultados de los valores de SP en LCR obtenidos a través de la técnica ELISA (Figura 32):

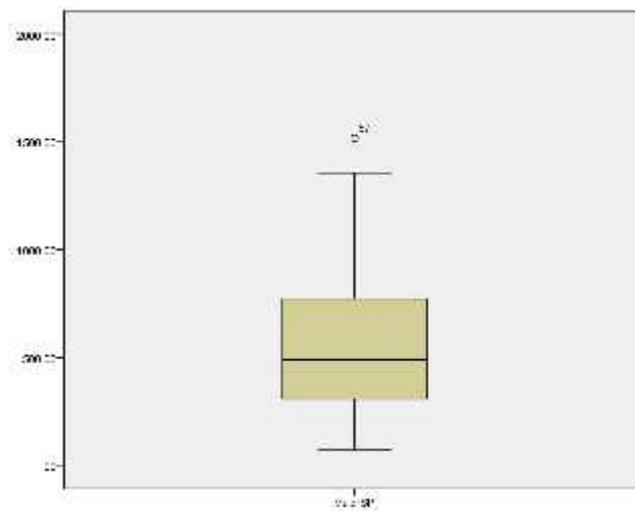


Figura 32: Valores SP

Hemos obtenido un valor medio de 576,53 pg/ml (428,01 fmol/ml), intervalo de confianza al 95% de 489,31 a 663,74 pg/ml (363,25 a 492,75 fmol/ml), desviación típica de 346,3 pg/ml (257 fmol/ml), y mediana de 490,7 pg/ml (364,29 fmol/ml). El valor mínimo obtenido ha sido 70,72 pg/ml (52,5 fmol/ml), y el máximo 1518 pg/ml (1126,94 fmol/ml) (rango=1447,28 pg/ml, es decir 1074,44 fmol/ml). El p25 se sitúa en 298,65 pg/ml (221,71 fmol/ml), el p50 en 490,7 pg/ml (364,29 fmol/ml), y el p75 en 785,6 pg/ml (583,22 fmol/ml) (Figuras 32 y 34).

Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra se confirma que los valores de SP en LCR de RN siguen una distribución normal (Figura 33).

Figura 33: Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		ValorSP
N		63
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	576,5306
	Desviación típica	346,30867
Diferencias más extremas	Absoluta	,114
	Positiva	,114
	Negativa	-,080
Z de Kolmogorov-Smirnov		,903
Sig. asintót. (bilateral)		,388

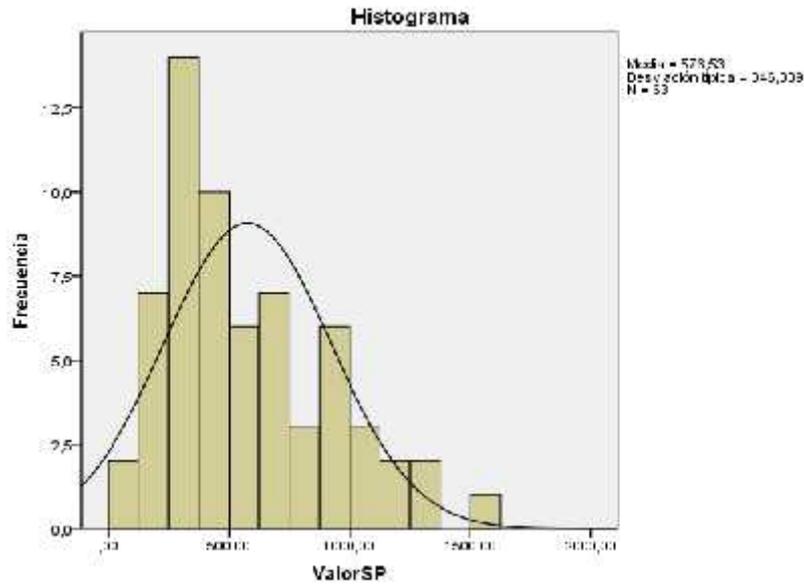


Figura 34: Histograma sobre la distribución de los valores de SP

**CORRELACIONES:**

**a) Edad:**

Aplicando el test de correlación de Pearson, no observamos que exista correlación alguna entre los niveles de SP y la edad (correlación de Pearson 0,011, significación bilateral de 0,929), como se aprecia en el siguiente esquema de nube de puntos (Figura 35):

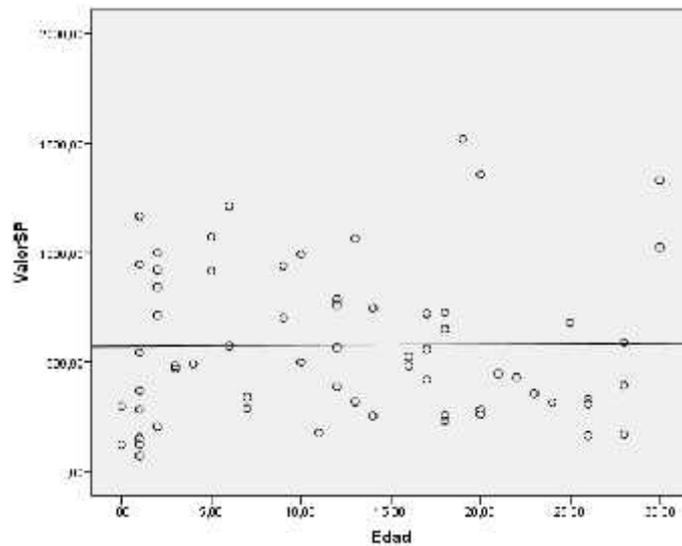


Figura 35: Nube de puntos sobre la correlación Edad/Valor SP

**b) Edad gestacional:**

Tampoco se ha demostrado que exista correlación entre los niveles de SP en LCR y la edad gestacional (correlación de Pearson  $-0,057$ , significación bilateral de  $0,657$ ), como se aprecia en el siguiente esquema (Figura 36):

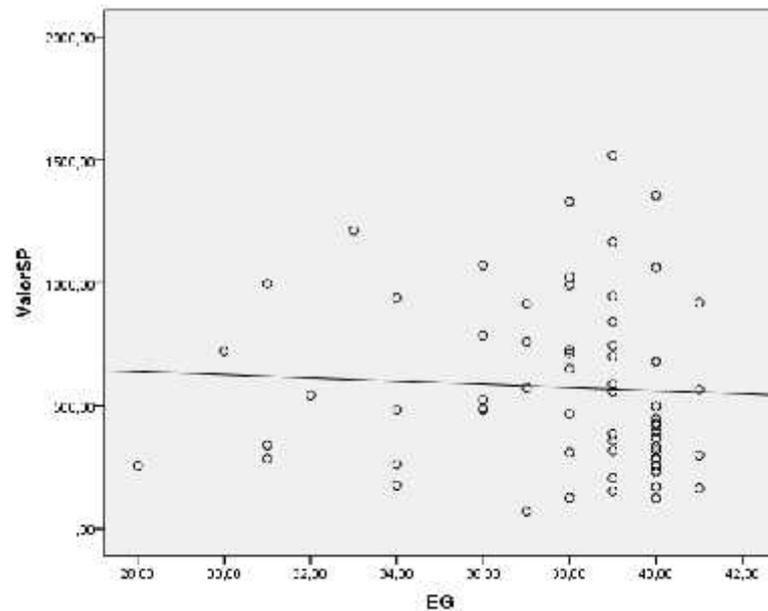


Figura 36: Nube de puntos sobre la correlación EG/Valor SP

**c) PCR:**

No hemos obtenido correlación entre los niveles de SP en LCR y los de PCR plasmáticos (correlación de Pearson  $-0,04$ , significación bilateral de  $0,755$ ) (Figura 37)

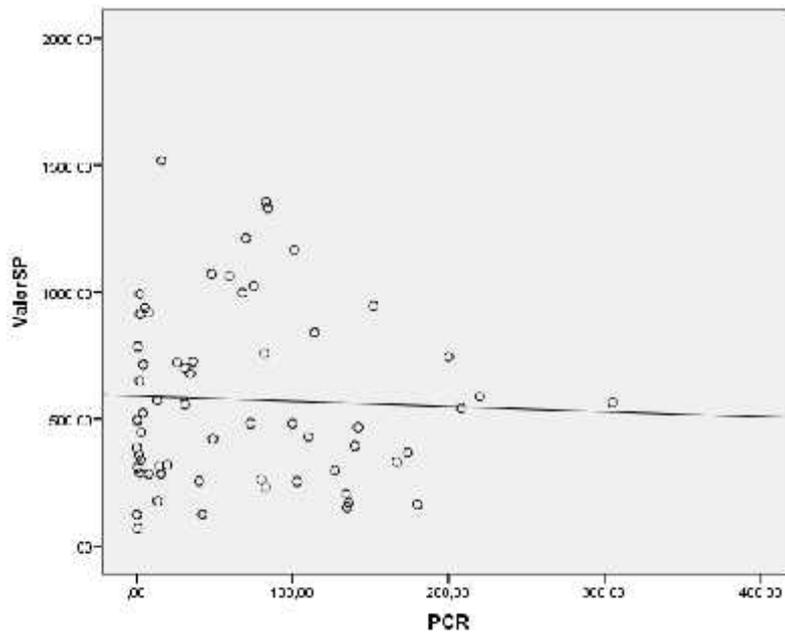


Figura 37: Nube de puntos sobre la correlación PCR/Valor SP

Si nos centramos en el diagnóstico final que se otorgó a cada paciente, los mismos y sus frecuencias quedan reflejados en el siguiente gráfico (Figura 38):

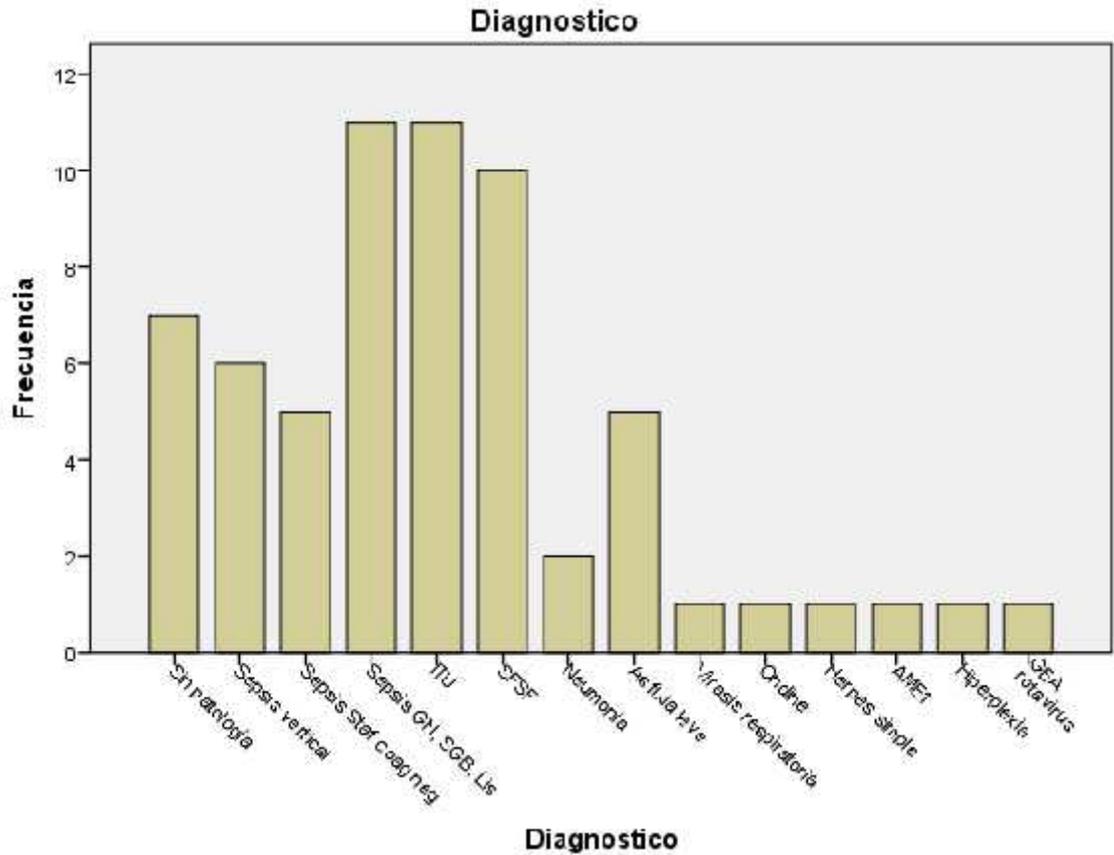


Figura 38: Diagnóstico final de los RN sometidos a PL

Así, en 7 RN no se encontró patología alguna, 6 se diagnosticaron de sepsis vertical, 5 de sepsis por *Stafilococo coagulasa negativo*, 11 de sepsis por Gram negativo, *Listeria* o *Streptococo del grupo B*, 11 de ITU, 10 de síndrome febril sin foco o causa evidente (SFSF), 2 neumonía, 5 asfixia leve, y 1 de cada uno de los siguientes diagnósticos: virasis respiratoria, enfermedad de Ondine (síndrome de hipoventilación central), infección por virus del herpes simple, atrofia muscular espinal tipo I y GEA por rotavirus.

# **V. DISCUSIÓN**

La SP se encuentra ampliamente distribuida en el reino animal. Su expresión, junto con la de su receptor NK1, se ha comprobado en la práctica totalidad de órganos y tejidos de diferentes especies de mamíferos. Así mismo, la SP se ha aislado en todos los fluidos orgánicos: sangre, LCR, orina (Altuntas, 2014), saliva (Parris, 1990), líquido peritoneal (Sanfilippo, 1992), leche materna (Ducroc, 1995)..., por lo que prácticamente podemos afirmar que es ubicua en todo el organismo. Desde su descubrimiento en 1931 por Von Euler y Gaddum, el interés por este undecapéptido de la familia de las TK ha ido en aumento. Desde hace varias décadas se atribuyen a la SP acciones como neurotransmisora y/o neuromoduladora en distintas áreas a nivel cerebral (Quigley, 1991; Bouras, 1990; Pernow, 1983; Jansen, 1991; Nicoll, 1980; Mantyh, 1989). El que los NP se encuentren en el SNC a concentraciones entre 1000 y 100.000 veces menores que los neurotransmisores clásicos nos da una idea del carácter regulador, controlador y hegemónico que ejercen los primeros sobre los segundos dentro de una supuesta jerarquía en su estructura. La SP posee propiedades lipofílicas, y difunde fácilmente la BHE (Banks, 1985). El LCR está en contacto directo con el líquido extracelular del SNC, por lo que los niveles peptídicos del LCR deben ser un fiel reflejo de la actividad neuronal (Liu, 1997). La SP liberada desde los nervios periféricos aumenta la permeabilidad del endotelio vascular, la proliferación de linfocitos T, activación de mastocitos, liberación de histamina y quimiotaxis de leucocitos (Payan, 1989; Pernow, 1983). Además, representa un importante eslabón de unión entre el sistema inmune y el sistema nervioso (Marshall, 1990; Payan, 1989; Ferrell, 1986; Nicoll, 1980; Wozniak, 1989). En un reciente estudio se ha visto cómo la SP es capaz de alterar la BHE actuando sobre su complejo sistema de barrera en las células endoteliales, las llamadas “uniones estrechas”. Este es el mecanismo por el cual las células metastásicas del cáncer de mama alteran la BHE a través del aumento en la liberación de SP seguido de TNF-

y Angiopoyetina-2 (Rodriguez, 2014). Otro elemento importante en la permeabilidad de la BHE son los transportadores “MDR1 P-glycoprotein”, encargados de “expulsar” de esta puerta del SNC ciertos elementos tóxicos anfipáticos, entre los que podría encontrarse la SP, y por tanto serviría para intentar regular las concentraciones de la SP en SNC (Elferink, 2001).

Se ha intentado estudiar el papel de la SP en varias patologías mediante la medida de sus niveles en plasma y en LCR. Para ello, resulta fundamental en primer lugar el conocimiento de esos niveles en condiciones de normalidad. En LCR, esta tarea se ha acometido con resultados variables, tanto en niños como en adultos (Tamet, 1985; Liu, 1997; Nagamitsu, 1998; Nutt, 1980; Clark, 1994; Carpenter, 2007; Geracioti, 2006). En todos ellos las determinaciones se han llevado a cabo mediante técnicas de RIA con ciertas modificaciones, y nunca con una muestra lo suficientemente amplia de sujetos (Tabla 20).

	SP fmol/ml	N
Tam	9,5 ± 1,5	5
Liu	12,3 ± 2,8	9
Nagamitsu	6,53 ± 1,04	9
Nutt	7 ± 0,6	18
Clark	0,79 ± 0,51	37
Carpenter	49,8 ± 26,2	19
Geracioti	22,2 ± 2,8	6

Tabla 20: Valores de SP en LCR en adultos según diferentes estudios, obtenidos mediante RIA

Así, según Tam et al estos valores se situarían en  $9,5 \pm 1,5$  fmol/ml, para Liu et al en  $12,3 \pm 2,8$  fmol/ml, para Nagamitsu et al  $6,53 \pm 1,04$  fmol/ml, para Nutt et al  $7 \pm 0,6$

fmol/ml, según Clark et al  $0,79 \pm 0,51$  fmol/ml, Carpenter et al  $49,8 \pm 26,2$  fmol/ml, y para Geraciotti et al, del mismo grupo investigador que el previo, de  $22,2 \pm 2,8$  fmol/nl.

En la edad pediátrica los resultados de búsqueda de valores basales de SP en LCR son aún más escasos, y en RN prácticamente inexistentes. Así, para Tam et al estos valores serían de  $141 \pm 14,2$  fmol/ml para RNT, de  $250 \pm 28,2$  fmol/ml para RNPT y de  $50 \pm 2,3$  fmol/ml para niños de 1 a 6 años; para Nagamitsu et al serían de  $11,34 \pm 3,12$  fmol/ml para lactantes entre 1 mes y 1 año y de  $8,41 \pm$  fmol/ml para niños entre 1 y 10 años (Tam, 1985; Nagamitsu, 1998).

Tam et al estudiaron mediante RIA los valores basales de SP en las diferentes edades, desde el feto hasta el adulto, obteniendo los resultados que se muestran: (Tabla 21).

Grupo de edad	SP (fmol/ml)	n	p
Fetos (11-20 semanas)	$22700 \pm 830$	10	
RNPT (23-31,5 sem)	$250 \pm 28,2$	8	< 0,001
RNT (1-14 días)	$141 \pm 14,2$	5	< 0,02
Niños (1-6 años)	$50 \pm 2,3$	6	< 0,001
Adultos (21-60 años)	$9,5 \pm 1,5$	5	< 0,001

Tabla 21: Niveles de SP en LCR en “humanos normales” en relación a la edad. (Tam, 1985).

Se trata del trabajo encontrado en la bibliografía que más se aproxima a nuestro objetivo, aunque en este caso las determinaciones de SP se realizan mediante RIA, y

además la muestra de sujetos en general y de RN en particular es demasiado escasa como para poder establecer conclusiones definitivas en cuanto a asentar los valores normales de SP en LCR. Su objetivo era más bien demostrar cómo los valores de SP en LCR disminuyen a medida que avanza la edad, lo cual queda patente especialmente al observar los elevados valores que se alcanzan en la época prenatal, motivo por el que concluyen que la SP deben desempeñar un papel fundamental en el neurodesarrollo desde etapas muy precoces de la vida. Como hipótesis, atribuyen estas elevadas concentraciones a tres posibles mecanismos: 1) podría haber un aumento en las tasas de secreción. Las concentraciones de SP en la médula espinal son generalmente más bajas en etapas precoces del desarrollo comparado con la madurez, pero aun considerando esto las tasas de secreción podrían ser elevadas. 2) Podría deberse a tasas más bajas de degradación de la SP, en LCR o bien en médula espinal. Aunque el LCR tiene por sí mismo la capacidad de degradar la SP, las tasas de degradación son generalmente bajas, y por tanto improbable que se trate de un fenómeno fisiológicamente relevante. Es más plausible suponer que las enzimas tisulares son las que realmente degradan la SP en su ruta de difusión hacia el LCR. Si la maduración de este sistema enzimático fuese relativamente lenta, eso podría explicar las elevadas concentraciones de SP en etapas precoces del neurodesarrollo debido a disminución de la degradación. 3) La última posibilidad sería que hubiera una mayor difusión desde el tejido de la médula espinal hacia el LCR. Las barreras físicas que influyen en la difusión de SP desde el tejido nervioso hasta el LCR continúan siendo desconocidas. Pero si estas barreras estuvieran escasamente desarrolladas en fetos y RN, como cada vez parece más probable, esto podría explicar las elevadas concentraciones de SP en LCR en estas etapas (Tam, 1985).

Nuestros resultados, obtenidos mediante la técnica de ELISA, son los siguientes: Valor medio de SP de 576,53 pg/ml. Con el Cayman Kit para determinación de SP en líquidos biológicos se obtienen valores en pg/ml. Dado que en la literatura en la mayoría de las ocasiones estos valores se expresan en fmol/ml, hacemos fácilmente la conversión teniendo en cuenta que el peso molecular de la SP es de 1347,63 g/mol, obteniendo un resultado de **428,01 ± 257 fmol/ml**, (intervalo de confianza al 95% de 363,25 a 492,75 fmol/ml).

Clark et al llegaron a la conclusión con sus trabajos que existe correlación entre los niveles plasmáticos de SP y los de LCR. Se obtuvieron muestras de LCR y plasma de 37 pacientes sometidos a PL con carácter diagnóstico, elegidos de forma randomizada, con edades comprendidas entre 23 y 79 años. Los criterios de exclusión fueron el presentar clínica de demencia o el haber sido sometidos a terapia intratecal de cualquier tipo. Como resultado obtuvieron una correlación significativamente positiva entre los niveles de SP en plasma y LCR ( $1,075 \pm 0,7$  para LCR y  $1,195 \pm 1,1$  para plasma), con  $p=0,0001$ . Esto supondría un gran avance para la simplificación de futuras investigaciones sobre los niveles de SP relacionados con distintas patologías, al poder obtener únicamente uno de los dos tipos de muestras, dado que por ejemplo el LCR es más difícil de obtener por los potenciales efectos secundarios relacionados con la PL, pero de más sencillo procesamiento que el plasma, y por otro lado la investigación de niveles de SP en plasma es más fácil de obtener pero más difícil de procesar por la necesidad de llevar a cabo procesos de purificación para separar el NP de proteínas plasmáticas, mientras que en LCR estos procesos no serían necesarios, pudiéndose procesar y congelar directamente tras su obtención (Clark, 1994). Revisado el artículo, sorprende que no se mencione el tipo de unidades utilizadas, con lo cual resulta difícil

poder discutir con fundamentos sus resultados. Bueno (2014) determinó los valores normales de SP en sangre de cordón de RN mediante técnica de ELISA al igual que en nuestro estudio, obteniendo unos valores de  $196,09 \pm 64,53$  fmol/ml. Puede considerarse que sería el método más similar al nuestro, realizado en el período neonatal, sobre una población de características similares, en un período de tiempo similar (prácticamente coincidente), con el mismo kit comercial (Cayman) y por el mismo equipo investigador, aunque como inhibidor de la degradación enzimática se utilizó Aprotinina en lugar de O-Phenantroline, y se realizó purificación mediante pase por columnas y secado, no llevado a cabo en nuestro caso. Teniendo en cuenta esto, si comparamos ambos resultados no podemos decir en nuestro caso que exista correlación entre los niveles de SP en plasma y LCR como el resultado obtenido por Clark et al, ya que los niveles normales de SP obtenidos en LCR prácticamente doblan los obtenidos en sangre de cordón en las mismas condiciones de normalidad. Esto, por tanto, invalidaría las conclusiones de Clark et al sobre la indiferencia de realizar medición de SP en sangre o LCR, ya que los resultados no son extrapolables.

La evaluación de antagonistas de SP/NK1 como agentes terapéuticos y el uso como marcador de la SP para monitorizar los procesos inflamatorios enfatizan la necesidad de contar con métodos exactos en la medición de la SP en fluidos corporales con el más alto nivel de precisión, sensibilidad y reproductibilidad posibles (Campbell, 2006). Tam et al llevaron a cabo un preestudio para tratar de determinar la estabilidad de la SP en LCR. Para ello, alicuotaron una única muestra de LCR e incubaron las alícuotas con o sin SP exógena (2 pmol/ml) a 4, 22 y 37°C, de 0 a 72h, e inmediatamente después congeladas a -40°C previamente al radioinmunoensayo (RIA). Además, estudiaron los efectos de la adición de 1:10 O-Phenantroline (5mM),

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (2,5 mM) o Trasylol® (10%) (aprotinina) a las alícuotas de LCR incubadas 37°C de 0 a 72h con 2 pmol/ml de SP. Se observó una pérdida gradual de la inmunorreactividad de la SP exógena dependiente tanto de tiempo como de temperatura. A 37°C, la concentración de SP se redujo hasta el 50% en 4h, a 22°C tardó 8h en sufrir la misma pérdida. Comprobaron que la adición de 1:10 O-Phenantroline consiguió inhibir completamente la degradación de SP exógena, por lo que las concentraciones se mantuvieron constantes durante las 72h de incubación a 37°C. EDTA resultó ser sólo parcialmente efectivo, y el Trasylol® no afectó a la degradación (Figura 39). Así, acordaron añadir 1:10 O-Phenantroline de manera rutinaria a todas las muestras de SP en LCR (Tam, 1985).

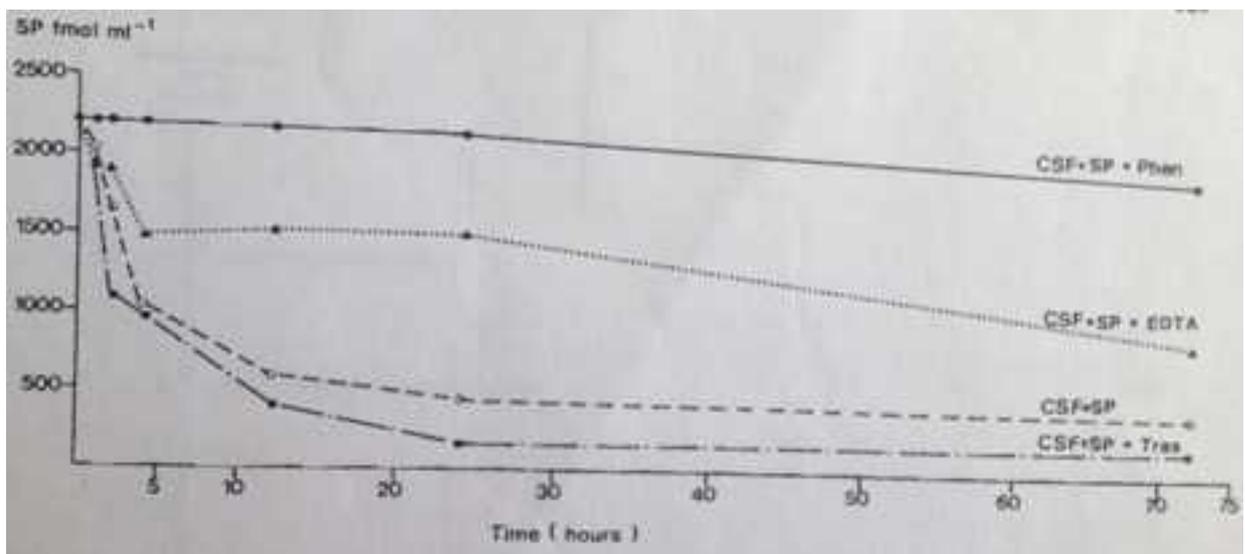


Figura 39: Degradación de la SP en LCR. Alícuotas de la misma muestra se incubaron a 37°C con y sin SP exógena (2 pmol/ml). Los inhibidores enzimáticos 1:10 O-Phenantroline, EDTA y Trasylol fueron añadidos a las alícuotas de LCR con SP exógena. Se observa que la pérdida de inmunorreactividad fue exitosamente inhibida por 1:10 O-Phenantroline (Tam, 1985).

En base a estas experiencias es por lo que nosotros también decidimos añadir 1:10 O-Phenantroline a todas nuestras muestras. Bueno 2014, en un estudio piloto con 6 muestras, analizaron los valores de SP en sangre de cordón umbilical añadiendo aprotinina (Trasylol®) y sin ella, en alícuotas de las mismas muestras. La aprotinina es

un agente que inhibe a las proteasas que se encuentran en el plasma. No hubo diferencias significativas entre valores utilizando aprotinina o sin ella, pero decidieron usarla por las recomendaciones dadas en la literatura tanto si se realizaba la medición por ELISA (Campbell, 2006; 2009) o por RIA (Ashina, 1999).

Existe una amplia variabilidad en relación a los resultados de las determinaciones de los niveles de SP en los diferentes fluidos en los que se han publicado. Esto puede ser explicado por varios motivos, entre los cuales destaca la variedad de los métodos o técnicas utilizados como son; RIA (radioinmunoanálisis), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), que utiliza la absorbancia con ultravioleta, electroforesis capilar usando una fluorescencia inducida por láser; y el enzimoimunoanálisis (ELISA). La SP existe libre y unida a proteínas de alto peso molecular (>400.000 Da) y de mediano o intermedio peso molecular (>58.000 Da) de forma reversible y no específica a través de ión hidrógeno (Corbally, 1990). Esto obliga a utilizar métodos de depuración ó extracción que permiten romper esa unión débil de la SP mediado por el ión hidrógeno a las mencionadas proteínas. Para ello se utilizan los siguientes métodos de purificación antes de la determinación de los niveles de SP como pueden ser:

a) La filtración de las muestras biológicas a través de geles o columnas de filtración repetidas con microporos con menor tamaño al de las proteínas anteriormente comentadas, consiguiendo así la mayor recuperación de la SP libre y la unida a proteínas de bajo peso molecular. Utilizando acetonitrilo al 60% con ácido trifluoracético al 1% se obtiene una recuperación de la SP de hasta el 90% (Fehder, 1998).

b) La utilización de métodos de acidificación de las muestras utilizando buffer con fosfato citrato a pH 2,6 para conseguir la mayor u óptima recuperación de niveles de SP tanto en suero como en plasma (Campbell, 2009).

c) La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Rissler, 1995).

La elección de la técnica de purificación, también interfiere en el resultado de los niveles de SP. Autores como Fehder, abogan por la purificación de la muestra de suero para una menor interferencia en la medición y para que los rangos de los valores obtenidos sean menores. Bueno et al, previo a la determinación de niveles de SP en sangre de cordón de RN, llevaron a cabo un estudio piloto con seis muestras, utilizando en un primer ensayo medición sin purificación y en un segundo la medición de SP con purificación de las muestras, consistente en el paso previamente acidificadas, por columnas de filtración C18 SPE de 200 mg repetidas veces, obteniendo valores más elevados de SP en las muestras purificadas (Bueno, 2014).

Parece haber consenso en la necesidad de la utilización de estas técnicas de “extracción” o “purificación” previas al análisis propiamente dicho (RIA, ELISA...) cuando hablamos de la cuantificación de SP en suero o plasma (Campbell, 2006; Bueno, 2014). En lo referente al LCR, aunque clásicamente también se llevaban a cabo técnicas de purificación de SP dados los buenos resultados obtenidos en suero/plasma (Tam, 1985; Vaeroy, 1987; Vaeroy, 1988; Russell, 1994), las últimas tendencias recaen en la no necesidad de llevar a cabo este paso (Clark, 1994; Matsuishi, 1996; Clark, 1996; Geraciotti, 2006; Carpenter, 2008). Liu et al describen cómo en estudios previos observaron una considerable mayor pérdida de la actividad peptídica al utilizar preseparación en columnas o cartuchos de gel en muestras con concentraciones muy bajas del péptido, como sería el LCR (Liu, 1997). Otra posible razón sería que en LCR la concentración de proteínas es muy baja en comparación con la sangre (15-45 mg/dl

frente a 6-8 g/dl, de hecho), por ello, y teniendo en cuenta que la técnica ELISA únicamente mide SP libre (no unida a proteínas), lógicamente no existiría la necesidad de usar técnicas de purificación con columnas. Así, el equipo de Fred Nyberg en Suiza describieron originariamente con detalle el método de purificación de las muestras de LCR para la determinación de SP previamente a la realización del RIA (Vaeroy, 1987), para posteriormente describirlo sin purificación, al haber comprobado experimentalmente la no necesidad de su uso e incluso las ventajas de obviarlo (Liu, 1997).

Otra razón que justifica la poca uniformidad de los valores que se han publicado hasta el momento, es la existencia dentro de un mismo método elegido (en este caso ELISA), de cierta variabilidad entre las distintas casas comerciales. Entre los más utilizados están: Península, Cayman y R&D systems. En nuestro caso, hemos utilizado un kit comercial de Cayman, uno de los más utilizados a la vez que documentado y contrastado con respecto a otras casas comerciales que usan la técnica ELISA, lo que nos proporcionó más seguridad en la determinación de concentraciones de SP (Fehder, 1998; Michaels, 1998; Campbell, 2006).

Los trabajos encontrados en los que se han determinado niveles de SP en LCR de RN son relativamente antiguos, por lo que la técnica empleada en todos ellos ha sido el RIA. En nuestro caso, siguiendo la línea actual de la mayoría de los investigadores en la materia, se ha elegido la técnica ELISA como método de cuantificación por sus innegables ventajas: rapidez, precisión y su relativa sencillez de realización en comparación con otros métodos. Aunque en la literatura se describe que existe una alta correlación entre los resultados obtenidos por RIA y por ELISA para la determinación de las concentraciones en plasma de determinados neuropéptidos (NKB) y por lo tanto no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con ambas técnicas,

otros autores han obtenido resultados contradictorios según la técnica utilizada (Hennig, 1995), y resulta obvia la posibilidad de obtener resultados diferentes según la técnica empleada. Existen innegables ventajas del método ELISA sobre el método RIA: el primero es más simple, se pueden obtener resultados en un día a diferencia (con RIA se precisan al menos 2 ó 3 días), no utiliza material radioactivo y es más económico (Geissbuehler, 2007; Page, 2010). Por lo tanto, podemos resumir que las ventajas de la técnica ELISA serían las siguientes: versátil, simple en su realización, reactivos económicos, gran especificidad y sensibilidad (esto último debido a la amplificación de la señal que emite el segundo anticuerpo). Por todo ello, en las últimas décadas ELISA resulta ser el método más generalizado para la determinación de SP en distintos fluidos corporales.

Nuestros valores resultan ser superiores a los descritos en otras series, si bien prácticamente no existen series de RN en las que se hayan determinado valores normales de SP en LCR, y las descritas (Tam, 1985) son escasísimas en número de individuos como para poder generalizar y establecer valores de referencia para futuras investigaciones. En lo referente al método empleado, uno de los motivos de la obtención de valores más elevados de SP en nuestra serie podría ser la adición de 1:10 O-Phenantroline como inhibidor de la degradación a las muestras, práctica de momento no generalizada, si bien Tam et al (1985) también la utilizaron y sus valores obtenidos para 13 RN prácticamente son la mitad de los nuestros. Otro motivo podría ser el empleo de ELISA en lugar de RIA. Quizás el motivo fundamental sea la presencia de un número de muestras con diferencia más elevado que en las otras series, lo cual nos permite establecer y asentar los valores de referencia que necesitábamos. Además, conociendo el hecho que la SP, al unirse al receptor NK1, induce mitogénesis en células normales,

en células tumorales (Luo, 1996; Muñoz y Coveñas, 2010) y en células madre (Kim, 2015), es decir, que es un mitógeno universal, unido al hecho que el RN es un organismo en crecimiento con una esperanza de vida de 80 o más años, resulta fácil deducir que los valores de SP tanto en sangre como en LCR de los RN deben ser más elevadas que en los adultos. Otro hecho que justificaría la obtención en nuestra serie de unos valores de SP en LCR de RN relativamente más elevados con respecto a lo publicado, es la obtención previa por otros autores de valores mucho más altos en fetos ( $22700 \pm 830$  fmol/ml) (Tam, 1985), y patologías del período perinatal como la espina bífida (del orden de  $864 \pm 357,6$  fmol/ml en RN y 150.000 fmol/ml en el feto) (Tam y Lister, 1984), y neonatal como el síndrome doloroso (del orden de 14,46 ng/ml) (Gadzhieva, 2009), por lo es lógico pensar que valores en torno a 400 fmol/ml, como los obtenidos en nuestro caso, puedan considerarse normales en un RN libre de patología.

En nuestra serie no existe diferencia significativa en los valores obtenidos según la edad gestacional, ni tampoco según el día de vida, mientras que Tam et al (1985) demuestran cómo los valores de SP disminuyen con la edad, tanto pre como postnatal, aunque cabe tener en cuenta que nuestro estudio se desarrolla en un período de tiempo de la vida relativamente corto como son los 30 primeros días, por lo que resulta bastante lógico que no exista diferencia en nuestros valores. Como acabamos de comentar, tampoco hemos encontrado diferencia con respecto a la edad gestacional, si bien si estratificáramos los resultados por edad gestacional, los grupos de menores edades gestacionales resultarían reducidos en número como para poder establecer conclusiones fiables en este aspecto, pero por otro lado cabe en la discusión decir que autores que sí han encontrado tal diferencia disponían de un número de pacientes prematuros aún más

escaso que el nuestro. Nagamitsu et al (1998) estudiaron los cambios relacionados con la edad de los valores de SP y  $\beta$ -endorfina en LCR en 39 pacientes neurológicamente sanos de edades comprendidas entre 1 mes y 10 años, así como los de 9 controles de edad adulta, concluyendo que los niveles de ambos péptidos poseen una correlación fuertemente positiva, que sufren un pico durante el primer año de vida para luego descender conforme aumenta la edad, por lo que vuelve a observarse la tendencia indicada por Tam PKH et al. El número de pacientes de 1 mes a 1 año era de 15 (ninguno por lo tanto en el período neonatal), y la técnica empleada fue RIA. No encontraron correlación entre edad y niveles de SP en los sujetos en edad adulta, al igual que Nutt et al (1980) y Bach et al (1992), que por lo tanto se puede considerar que se mantienen constantes con el paso de los años, si bien es cierto que tampoco han sido suficientemente estudiados en la senectud. Charlton y Helke (1986) sugirieron mediante inmunohistoquímica una disminución de los receptores de SP en médula espinal de rata también relacionada con la edad. Otra posible explicación de decremento de SP durante los 10 primeros años de vida sería debida al patrón madurativo de las enzimas que actúan sobre el pro-neuropéptido inicial o neuropéptido precursor, como sugirieron Joshi et al (1995) en relación a la  $\beta$ -endorfina. Otra hipótesis sería que los cambios en los niveles de SP relacionados con la edad sean debidos a la influencia de neurotransmisores clásicos, mediante el fenómeno de cotransmisión. La expresión génica de la preprotaquiquinina precursora de la SP es activada por agonistas de la dopamina (Haverstick et al, 1989). Quizás estudios más profundos sobre los fenómenos de cotransmisión relacionados con la SP aclaren algo más la relación de sus niveles con la edad, especialmente en los primeros 10 años de vida.

En nuestro caso, y debido al mayor número de muestras del que hemos podido disponer, estaríamos en condiciones de concluir que los niveles de SP en LCR de neonatos no varían significativamente durante el primer mes de vida, al menos en recién nacidos a término. Tampoco hemos apreciado diferencias significativas entre los prematuros, si bien es cierto que el número de éstos en nuestra serie no era muy amplio como para poder establecer conclusiones en este grupo de edad gestacional. Bueno et al (2014) tampoco obtuvieron diferencias en los valores de SP en sangre de cordón según la edad gestacional, aunque todas las muestras estudiadas correspondían a RN a término de 37 a 41 semanas. De todos modos tampoco se encontraron diferencias según la edad materna, aunque esto es concordante con la mayoría de los estudios sobre niveles de SP en adultos, en los que éstos se mantienen bastante constantes a estas edades. En el lado opuesto, en el estudio llevado a cabo por Wong et al (2010) los valores plasmáticos de SP en RN de diferentes edades gestacionales experimentaron un ascenso gradual durante los tres primeros días de vida, para después disminuir. Estos resultados vuelven a ir en contra de los resultados obtenidos por Clark et al (1996) sobre la correlación entre niveles de SP en plasma y LCR, ya que Wong obtiene al determinarlos en plasma que sufren oscilaciones en los primeros días de vida, mientras que en LCR según nuestro estudio se mantienen constantes en ese mismo periodo. Scholle et al (1990) determinaron los valores plasmáticos de SP en RN a partir de la tercera semana de vida, con resultados en función de la edad gestacional corregida (que osciló de 4 a 63 semanas), obteniendo que las concentraciones medias plasmáticas de SP en RNPT (32) eran de  $27,2 \pm 6,2$  pg/ml y en RNT (19) de  $38,3 \pm 7,7$  pg/ml, aunque cabe reseñar que los resultados de este estudio proceden de muestras de plasma no purificadas. La conclusión es que existe gran disparidad entre los valores de SP en plasma y LCR para las distintas series, aunque el nuestro es el primer trabajo que aporta un número de

muestras suficiente para establecer unos valores concluyentes de SP para RN en LCR. Nos topamos ante la ausencia de estudios con número suficiente de muestras sobre valores de SP en LCR de RN, con los que establecer posibles comparaciones con el nuestro para cotejar resultados, por lo que para RN sólo podemos hacer un intento de aproximación con los valores obtenidos en plasma. En este sentido los valores obtenidos por Bueno et al (2014) para valores de SP en plasma de RNT en los primeros minutos de vida son los que más se aproximan a los nuestros, ya que resultan igualmente más elevados que en la mayoría de las series. Incluso teniendo en cuenta estas consideraciones, nuestros valores de SP en LCR de RN doblan los valores obtenidos por Bueno et al en plasma bajo las mismas condiciones, lo cual resulta lógico si consideramos que la SP se encuentra en concentraciones más elevadas en SNC que en plasma, ya que es allí donde mayormente se genera (Pernow, 1983; Pernow, 1985).

Al igual que sucedía como se comentó en la introducción con los valores normales de leucocitos en LCR, es necesario que comentemos en este apartado qué grado de sesgo podría suponer el que los RN de los que proceden las muestras no sean completamente “sanos” y por lo tanto “óptimos” para poder establecer de manera definitiva los valores “fisiológicos” de SP en LCR de RN. Para que el estudio resultara ético nuestros RN requerían indicación médica para la realización de PL, como en cualquier caso y muy especialmente en el caso de menores de edad. Los RN de la muestra presentaban factores de riesgo de infección perinatal, fiebre, elevación de reactantes de fase aguda (PCR), distrés respiratorio, hipotonía, signos de asfixia perinatal leve, reacción exagerada a estímulos o riesgo de transmisión de sífilis por infección materna. Todos los pacientes incluidos en el estudio han cumplido estrictos criterios de inclusión en los que se descartara cualquier patología con afectación del SNC, como crisis convulsiva, hemorragia, malformación, asfixia perinatal moderada-

severa y especialmente meningitis/meningoencefalitis o cualquier proceso inflamatorio, dado que es bien conocida la implicación de la SP en los estados patológicos que cursan con inflamación neurogénica. Esto nos da el grado de confianza suficiente para poder afirmar que los valores de SP obtenidos para LCR son realmente “basales”. Un dato importante que apoya esta aserción es el hecho de que no hemos encontrado correlación estadística alguna (empleando el coeficiente de correlación de Pearson) entre los valores de SP y de reactantes de fase aguda como es la PCR entre nuestros sujetos de estudio (véase Figura 37). Tam PKH et al (1985) concretamente en el caso de los 5 RNT, la PL se realizó como screening de procesos sépticos no relacionados con el SNC. En el estudio de Nagamitsu et al (1998) los 39 niños se sometieron a PL también para descartar posible infección del SNC. En un estudio previo (Nagamitsu, 1997) encontraron que los niveles de SP en LCR en estos casos no diferían entre niños con o sin fiebre. Por ello, concluyeron que la incidencia de fiebre en sujetos considerados “control” o “sanos” no influía en los niveles de SP en LCR. En el arduo empeño por afianzar los valores normales de leucocitos en LCR de RN, Martín-Ancel et al (Martín-Ancel, 2006), estudiaron el recuento de leucocitos en 30 RN con riesgo de transmisión vertical de toxoplasmosis tras descartarse ésta por los métodos habituales. Así evitaban el posible sesgo que supone el estudio en RN de “alto riesgo” tras descartar afección meníngea y no en RN realmente “sanos”. Concluyen que el recuento de leucocitos en RN “normales” es similar al del adulto, lo cual es concordante con un estricto control al paso de estas células al SNC por parte de la BHE. Una leve pleocitosis podría así encontrarse en RN sintomáticos sin infección del SNC, pero no ser un hallazgo dentro de la normalidad como se sospechaba hasta ese momento. La mayor permeabilidad a proteínas de la BHE en RN permitiría un paso más fácil de ciertas sustancias circulantes, tanto moléculas provenientes de microorganismos como mediadores

proinflamatorios. Aunque esto es sólo una hipótesis, implicaría que quizás otras moléculas implicadas en procesos inflamatorios como la SP podrían estar también ligeramente incrementadas en los RN de nuestro estudio. Una de nuestras muestras pertenecía a un RN hijo de madre con serología a sífilis positiva, en el que finalmente se descartó transmisión de la enfermedad. Los niveles de SP en este caso no son inferiores a los del resto. Aunque hablamos de una sola muestra, se trataría de un caso similar a los hijos de madre con serología positiva a toxoplasma del trabajo de Martín Ancel et al mencionado, por lo que podríamos tender a pensar que el sesgo del que hablamos queda bastante atenuado en nuestra serie. Syrogiannopoulos et al, en base al estudio previo de Bergström et al (Bergström, 1972) llevaron a cabo un estudio mediante el cual realizaron PL como evaluación inicial a 117 de los 206 lactantes menores de 3 meses ingresados por ITU confirmada bacteriológicamente. De los 117, en 15 se halló una pleocitosis estéril en LCR. Estos resultados implican que el 12,8% de los lactantes menores de 3 meses con ITU presentan una pleocitosis estéril concomitante (Syrogiannopoulos, 2001). El mecanismo por el cual se produciría una leve inflamación meníngea en los casos de ITU neonatal no es bien conocido. La pleocitosis estéril podría aparecer también unida a otras infecciones a distancia, como neumonía u onfalitis. A este fenómeno se le ha denominado “meningitis simpática” (Olson, 1985). En nuestra serie, los pacientes con diagnóstico final de ITU tampoco presentaron niveles de SP significativamente superiores al resto. En base a estas circunstancias podríamos aventurarnos a concluir que los niveles de SP no se ven afectados por la supuesta alteración de la permeabilidad de la BHE que aparecería en situaciones de infección sistémica o a distancia.

En lo referente al tamaño muestral, ha sido calculado estadísticamente a partir de la varianza de un estudio previo que nos ha servido como estudio “piloto” (Tam, 1985),

con lo que al menos para RNT el tamaño muestral sería más que suficiente para la precisión deseada ( $\pm 4$  pg/ml). No podemos asegurar lo mismo en relación a los RNPT, en los que según el estudio “piloto” previo llevado a cabo por Tam et al, necesitaríamos un número mayor para alcanzar la precisión conseguida para los RNT. No obstante, aunque más escasos en número, en los RNPT los valores de SP obtenidos no han presentado diferencias significativas con respecto a los RNT. Teniendo en cuenta el método empleado (ELISA), poco generalizado hasta el momento para la determinación de niveles de SP, consideramos que los valores obtenidos son fiables por no existir diferencias significativas entre los valores para ambos grupos de muestras, dado que todas se analizaron por duplicado. También es importante considerar en cuanto a la fiabilidad de nuestros resultados obtenidos la homogeneidad de la población, seleccionada con estrictos criterios de inclusión y exclusión. No en vano resulta ser la mayor población con diferencia de entre los escasos estudios presentes en la literatura actual, es decir es el mayor número de muestras analizadas de una población de RN, la más homogénea en la que se han estudiado valores de SP hasta el momento. Así, podemos concluir que los valores obtenidos podrían erigirse como la única referencia actual para SP en LCR de RN, que nos servirían para compararlos con sus desviaciones en distintos estados patológicos. En futuras investigaciones podrían tener aplicaciones terapéuticas mediante el bloqueo de los receptores NK1 con agentes farmacológicos específicos que bloquean las funciones fisiopatológicas de la SP, los denominados antagonistas de los receptores NK1. Si bien actualmente como hemos dicho son los únicos valores fiables existentes en la literatura, para poder establecerlos como referencia internacional definitiva sería necesario determinarlos en una muestra más amplia.

Muchas son las patologías del SNC en las que podrían tener aplicación agentes terapéuticos que bloqueen la acciones fisiopatológicas de la SP mediante su receptor NK1. En algunas de ellas poco a poco ya se va conociendo la implicación de la SP, y en otras esa implicación resulta aún teórica. Ejemplos de patologías del SNC del RN en las que podría tener aplicabilidad clínica un mayor conocimiento de su relación con el sistema SP/NK1 receptor serían ciertas malformaciones congénitas, la hipoxia perinatal y encefalopatía hipóxico-isquémica, traumatismos, el síndrome convulsivo, las hemorragias cerebrales (intraventriculares/parenquimatosas), hidrocefalia, retinopatía de la prematuridad, procesos infecciosos/inflamatorios como la meningoencefalitis y meningitis, así como el dolor que acompaña a múltiples patologías y procedimientos a los que eventualmente se puede ver sometido un RN, especialmente los ingresados en unidades de críticos.

Hace tiempo que se sospechan los efectos tróficos y las implicaciones en el neurodesarrollo que pueda tener la SP en el sistema nervioso en formación, ya desde el período embrionario. Así, Tam y Lister (1984) encontraron niveles elevados de SP en LCR en 10 RN y 1 feto con espina bífida, del orden de  $864 \pm 357,6$  fmol/ml en RN y  $150.000$  fmol/ml en el feto, (frente a  $141 \pm 14,2$  fmol/ml en 5 controles RN “sanos” y  $22.673 \pm 8.340$  fmol/ml en 10 controles fetos sin espina bífida), determinados mediante RIA. Dado que los niveles de SP en LCR están significativamente elevados en sujetos con espina bífida tanto pre como postnatalmente, consideran en su discusión que podría ser debido a que la SP desempeña un importante papel en el desarrollo de la médula espinal que se ve afectado de alguna manera en los casos de espina bífida. También podría ocurrir que, dado que se ha demostrado que la SP se encuentra relacionada con la percepción sensorial y los reflejos autonómicos, una concentración anormal de SP en LCR podría agravar los déficits neurológicos que aparecen en los casos de espina bífida.

Esto induce a pensar que en estos casos el empleo de fármacos que bloqueen los efectos de la SP podría en un futuro mejorar la calidad de vida de estos pacientes. Posteriormente De Felipe et al evidenciaron la implicación de la SP y su receptor NK1 en el desarrollo de la médula espinal durante la embriogénesis (De Felipe, 1995). La capacidad de la SP de promover el crecimiento neuronal es un fenómeno bien conocido. Se ha demostrado que en el área cortical subventricular y en el giro dentado del hipocampo del cerebro de rata, áreas ricas en células madres neuronales, la introducción de SP induce un aumento en el número de células progenitoras neuronales (Park, 2007). Recientemente se ha publicado que la SP es capaz de estimular la proliferación de células madre neuronales en la médula espinal tras un traumatismo medular, y lo hace vía MAPK (Kim, 2015). La SP también parece desempeñar un importante papel en el desarrollo de la retina. SP y receptores NK1 y NK3 se expresan en la retina en formación de ratones neonatos (Catalina, 2006), y de manera similar en ratas (NK1 y NK3) (Oyamada, 1999) y conejos (NK1 y SP) (Casini, 2004). Por lo tanto, es posible que la SP esté implicada en el neurodesarrollo de una manera mucho más generalizada y aún por explorar.

Existen datos que sugieren que la SP podría aportar algún tipo de efecto neuroprotector y podría estar envuelta en la reparación neuronal. Así, la SP podría disminuir los efectos neurodegenerativos causados por la sustancia B-amiloide inyectada en el cerebro de un animal vivo (Yanker, 1980; Kowall, 1991), y se sabe también que el daño neuronal produce un rápido aumento en el número de receptores de SP en los astrocitos circundantes (Mantyh, 1989). Varios autores han demostrado cierta evidencia sobre los efectos neuroprotectores de la SP (Narumi, 1977; Wall, 1982). En este aspecto la SP es capaz de proteger a las células granulares cerebelosas de la muerte celular inducida por la privación de suero y potasio (Amadoro, 2007). Se ha

comprobado un efecto protector mediado por el receptor NK1 en ganglios espirales disociados expuestos a un shock por privación de factores tróficos, efecto mediado por una inhibición de enzimas proapoptóticas (Lallemend, 2003). Sin embargo, estudios más recientes asocian a la SP, en el extremo radicalmente opuesto, claros efectos neurodegenerativos, con destrucción neuronal mediante apoptosis y muerte celular no apoptótica; esta paradoja pudiera estar relacionada con las concentraciones de SP, tratándose por tanto de efectos dosis-dependiente. La SP desempeña un papel fundamental en la degeneración funcional que sigue al daño cerebral agudo, tanto a nivel del SNC como periférico (Vink, 2004). También se ha relacionado la inflamación neurogénica inducida por NP como la SP y la NKA con el edema secundario al trauma cerebral (Nimmo, 2004). Aunque existen muchos factores que intervienen en el desarrollo de los déficits funcionales y morfológicos que acontecen tras un traumatismo cerebral, existe evidencia de que ciertos NP, en especial la SP, desempeñan un papel fundamental. La SP se libera tras un trauma cerebral agudo como parte de la respuesta de la inflamación neurogénica, mediante el aumento de la permeabilidad de la BHE y el desarrollo de edema vasogénico. A nivel celular, la SP ha demostrado producir muerte de células neuronales. La inhibición de la acción postraumática de la SP, bien mediante la prevención de su liberación o bien mediante el bloqueo con antagonistas de su receptor NK1 disminuiría el desarrollo de edema cerebral y por tanto produciría una importante mejoría en la evolución funcional posterior al trauma (Vink and van den Heuvel, 2010; Castro-Obregón, 2002). Es conocido que la SP es capaz de inducir en neuronas un tipo de muerte celular diferente de la apoptosis y la necrosis, y este efecto es tanto concentración-dependiente (a concentraciones nanomolares y hasta micromolares) como tiempo-dependiente. Las neuronas corticales, hipocámpales y estriatales destruidas no presentaban cuerpos apoptóticos, sino vacuolización. Sin

embargo, en sus experimentos no observaron la misma toxicidad sobre fibroblastos, ni siquiera a concentraciones milimolares. Comprobaron además que esta neurotoxicidad era mediada por el receptor NK1, ya que se inhibía de forma completa con antagonistas. Por lo tanto, concluyeron que el receptor NK1 es capaz de mediar un tipo de muerte celular programada no apoptótica (Castro-Obregón, 2002). Recientemente, ha sido publicado en pacientes con TCE que los niveles elevados de SP en sangre (concretamente superiores a 299 pg/mL) eran constitutivos de mal pronóstico (Lorente, 2015).

Se desconoce el papel que la SP podría tener en casos de hipoxia/asfixia perinatal y sus consecuencias, la encefalopatía hipóxico isquémica. Este es, sin duda, un espectro patológico de vital importancia en el período neonatal, consumiendo gran cantidad de recursos, y cuya incidencia, pese a los avances en obstetricia, se mantiene prácticamente constante en los mejores hospitales del mundo. La encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) se define como el síndrome neurológico que aparece en el RN tras un episodio de hipoxia y/o isquemia acaecido durante el periodo perinatal. El término de asfixia no es sinónimo al de EHI. La asfixia es causa mientras la EHI es efecto y no siempre aquella va a provocar lesión encefálica. Los fenómenos hipoxicoisquémicos pueden causar trastornos de la función pulmonar, cardiovascular, digestiva, renal, hematológica y metabólica constituyendo en su conjunto el síndrome postasfíctico. Alrededor del 40 % de RN asfícticos padecen diversos grados de EHI, originándose el 90% de las lesiones cerebrales antes o durante el parto. La incidencia de encefalopatía postasfíctica se sitúa alrededor de 6 x 1000 RNT. En nuestro medio la asfixia es la 5ª causa de mortalidad neonatal. En la actualidad desconocemos si los niveles de SP se encuentran alterados en LCR de RN asfícticos, o si podría intervenir en el curso de la enfermedad actuando sobre los receptores NK1. Es conocido que ante

un evento hipóxico agudo las concentraciones de SP se ven incrementadas en las neuronas del núcleo del tracto solitario de ratón (Lindfors, 1986; Srinivasan, 1991). En el miocardio, se sabe que la SP es capaz de inducir cardioprotección tras fenómenos de isquemia-reperfusión tanto por su potente efecto vasodilatador coronario como mediante fenómenos antiapoptóticos actuando a través de su receptor NK1 y las vías intracelulares del fosfatidilinositol 3-kinasa/AKT. Así, la SP es capaz de proteger las células miocárdicas en casos de isquemia-reperfusión activando vías de supervivencia celular (Jubair, 2015). Al contrario, se ha demostrado sobre un modelo experimental de miocarditis vírica en ratón que la SP está 60 veces más elevada que en ratones no infectados (Robinson, 2009). Además, IL-1b, TNF $\alpha$  and IL-6 están implicadas en la fisiopatología de la miocarditis, e interesantemente la SP regula dichas citoquinas proinflamatorias. Observando en los ratones infectados cardiomegalia, inflamación cardíaca y necrosis, apoptosis e hipertrofia de cardiomiocitos, también se comprobaron en su estudio que los ratones knockout estaban totalmente protegidos de la miocarditis producida por el virus causante de la miocarditis experimental (Robinson, 2009). Probablemente, tanto Jubair et al como Robinson et al estén en lo cierto en sus aseveraciones, aunque aparentemente contradictorias, ya que en el primero las dosis bajas de SP (fisiológicas) puedan tener un papel beneficioso produciendo cardioprotección, mientras que en el segundo las concentraciones elevadas de SP (suprafisiológicas o patológicas) conllevan el efecto contrario de cardiotoxicidad.

De manera similar, se ha demostrado que la SP estimula la liberación de interleuquinas y produce hepatotoxicidad y apoptosis, y al contrario, tratando dichos ratones con antagonistas de los receptores NK1 se previene dicha hepatotoxicidad (Bang, 2003). Deng y Luo han comprobado igualmente cómo la SP participa en los

fenómenos de daño hepático tras hipoxia, y cómo los antagonistas de los receptores NK1 podrían frenar ese daño (Deng y Luo, 2011).

Al inducir un daño hipóxico-isquémico en ratas mediante la ligadura de la arteria carótida izquierda, y estudiar mediante inmunohistoquímica el contenido de SP en núcleo estriado a los 10 días del daño, se observa que las concentraciones de ésta disminuyen un 66% en el lado ipsilateral al daño y un 43% en el contralateral con respecto a controles, mientras que las concentraciones de dinorfina A aumentaron en el mismo experimento en un 481-285%, las de NPY disminuyeron en el lado ipsilateral y aumentaron en el contralateral (manteniéndose por tanto constantes si tenemos en cuenta el global del núcleo estriado), y las densidades de receptores dopaminérgicos D1 y D2 se vieron reducidas en un 24 y 22%, respectivamente. Esto pone de manifiesto las complejas alteraciones neuropeptídicas que acontecen a nivel cerebral tras un daño hipóxico-isquémico. El descenso en la concentración de SP podría tener efectos funcionales en la transmisión dopaminérgica, por el ya conocido fenómeno de cotransmisión, mientras que el aumento en las concentraciones de NPY y dinorfina A podrían reflejar un intento de compensación preservando la integridad de grupos neuronales, aumentando la síntesis de unos NP y disminuyendo la liberación de otros (Johnson, 1994). El factor hipoxia-inducible 1 (HIF1A) responde a los cambios en la disponibilidad de oxígeno en el entorno celular, siendo liberado en condiciones de hipoxia. Se encarga de regular los efectos de ésta, tales como la formación de neovasos, desarrollo del sistema vascular en el embrión, e incluso el desarrollo de tumores malignos (Benizri, 2008). El HIF1A resulta vital para el desarrollo. En mamíferos, la ausencia de genes HIF-1 trae como consecuencia la muerte perinatal. Además, el HIF1A desempeña un papel fundamental en la regulación del metabolismo en humanos (Formenti, 2010). La SP es capaz de aumentar considerablemente las concentraciones

de HIF-1 bajo condiciones de hipoxia, como se muestra en la Figura 40 (Walczak-Drzewiecka, 2008).

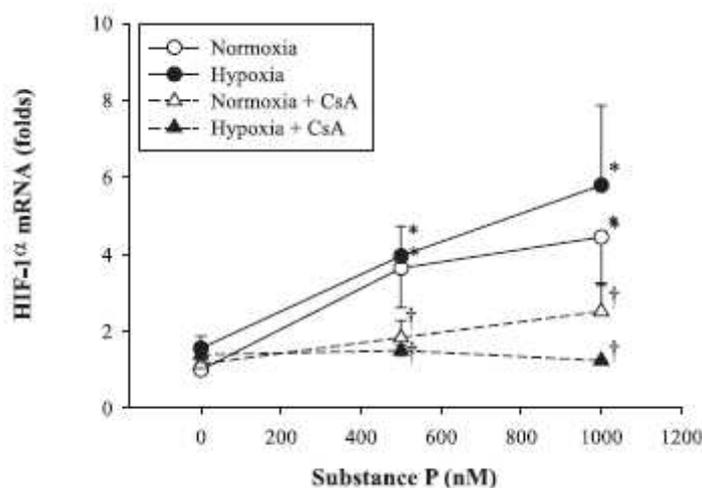


Figura 40: Aumento de los niveles de HIF1A conforme aumentan los de SP (Walczak-Drzewiecka, 2008)

Sin embargo, se ha demostrado que la SP regula la expresión de HIF1A a través de su gen *TAC-1* de manera que en la fase de reoxigenación tras hipoxia se ha observado que la expresión del gen *TAC-1* actúa inhibiendo la expresión del HIF1A mediante un retraso en la producción de SP en el estroma de la médula ósea, y la SP también se encargaría de frenar a la caspasa-3, un indicador de apoptosis y eritropoyesis. Se trataría de un efecto paradójico de la SP en en tejido estromal de médula ósea durante la fase de reoxigenación tras hipoxia (Qian, 2001). La SP es capaz de inducir inflamación neurogénica en el SNC tras una lesión isquémica al igual que ocurre tras un traumatismo cerebral, ya que tras el daño la SP perivascular es liberada produciendo una importante disrupción de la BHE y el desarrollo de edema vasogénico. Los antagonistas de los receptores NK1 se han mostrado eficaces en disminuir estos efectos deletéreos (Turner y Vink, 2013). Los efectos de la SP ante situaciones de hipoxia quedan patentes en el trabajo con modelo experimental de Springer et al, en el que la administración crónica de SP es capaz de producir hipertensión pulmonar a través de la inducción de la

angiogénesis y remodelación vascular, mediado por especies reactivas de oxígeno (Springer, 2003). En modelo experimental mediante la ligadura de la arteria mesentérica superior en ratas se demuestra cómo los antagonistas de los receptores NK1 son capaces de revertir los efectos de la SP ante situaciones de isquemia-reperfusión, como son principalmente el aumento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de neutrófilos, tanto localmente (intestino) como a distancia (pulmón) (Souza, 2002).

La retina ha sido clásicamente considerada como “una ventana al SNC”, o lo que es lo mismo, la única parte del SNC que puede ser directamente visualizada mediante una sencilla técnica, la oftalmoscopia, y muchas veces representa un fiel reflejo indirecto de diferentes patologías que pueden acontecer en el SNC. Dado el carácter proangiogénico de la SP, se ha postulado si quizás podría estar relacionada con la retinopatía inducida por oxígeno, como es el caso de la retinopatía de la prematuridad. Existen varios estudios en los que se ha relacionado la SP con la neoangiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro*. Ziche et al (Ziche, 1990 y 1994) describieron como la SP estimula la neovascularización *in vivo*, y la inducción de la proliferación de células endoteliales. Antagonistas específicos de la SP resultan eficaces en el bloqueo de esta respuesta en córnea de conejo. Fan et al confirmaron mediante sus experimentos en ratas la acción proangiogénica de la SP y mostraron del mismo modo su inhibición por antagonistas del receptor NK1 (Fan, 1993). Otro modelo experimental en ratas puso de manifiesto que la SP aumenta la angiogénesis por una acción directa mediada por los receptores NK1 en la microvascularización, siendo un proceso esencial en la cura de heridas y en la inflamación (Walsh, 1996). Además, la SP endógena podría estar implicada en la neoangiogénesis relacionada con la inflamación neurogénica (Seegers, 2003). La neoangiogénesis se ha relacionado con el incremento de la expresión del receptor NK1. La SP, tanto administrada de forma exógena como por un aumento de la

tasa endógena de la misma, produce un aumento neurogénico de la angiogénesis en ratas mediante la activación de los receptores NK1, y los antagonistas no peptídicos de estos receptores pueden inhibir la angiogénesis neurogénica que contribuye a la patogenia de algunas enfermedades (Seegers, 2003). En modelo experimental de ratón, la inoculación subconjuntival del antagonista de los receptores NK1 “spantide” durante la fase clínica de la queratitis herpética tuvo como resultado una significativa reducción de la opacidad corneal y de los fenómenos de angiogénesis acompañante que se dan en esta patología (Twardy, 2011), por lo que sería lógico pensar que los mismos fenómenos de inhibición de la angiogénesis mediante antagonistas de los receptores NK1 podrían darse en la retina. Se ha demostrado que la neuropatía que se puede producir tras terapias con láser retiniano es capaz de hacer que el órgano ocular pierda sus privilegios inmunes, y este hecho ocurre vía SP/NK1 receptor, ya que mediante antagonistas de los receptores NK1 se puede impedir esta pérdida de privilegios inmunes (Lucas, 2012). Sin embargo, pese a todos estos datos a favor de la implicación de la SP en la retinopatía del prematuro, Schmid et al no encontraron indicios, en sus experiencias con ratones sometidos a normoxia tras hiperoxia, de que la SP estuviera relacionada con la neoangiogénesis que se produce en la retinopatía inducida por oxígeno (Schmid, 2012). El óxido nítrico (NO) es un importante modulador del flujo sanguíneo ocular, y además es mediador en la respuesta vasodilatadora de los vasos oculares de múltiples neurotransmisores, como SP, insulina, histamina, bradiquinina y acetilcolina. El sistema L-arginina/NO se ha relacionado también con la retinopatía de la prematuridad (Schmetterer, 2001), y quizás en posteriores estudios se demuestre que la SP intervenga en esta asociación, y podamos actuar sobre la prevención y/o evolución de esta patología tan prevalente entre los grandes inmaduros mediante el bloqueo de los receptores NK1.

Otra patología del RN en la que cada vez se conocen más implicaciones de la SP es el síndrome convulsivo. Existen muchos datos que demuestran que la SP es proconvulsivante. Ya en 1986, Garant consiguió reducir significativamente las convulsiones inducidas en modelo experimental de rata (electroshock a máxima potencia e inyección de bicuculina) mediante la microinfusión de antagonistas de los receptores NK1 en sustancia negra (Garant, 1986). Ko et al estudiaron las concentraciones de SP, somatostatina, prolactina y VIP en 70 muestras de plasma y 32 de LCR en pacientes entre 1 mes y 18 años con distintos grados de epilepsia. Demostraron que los niveles de los cuatro péptidos estaban incrementados tanto en plasma como en LCR en los pacientes con grados más severos de la enfermedad, y por lo tanto con los casos más rebeldes a la medicación (Ko, 1991). Recientemente, Blanco et al demostraron un aumento en la expresión tanto de SP como de receptores NK1 en las neuronas y células gliales del hipocampo de pacientes con esclerosis mesial temporal. Esto confirmaría que la SP tendría un efecto neurotóxico, produciendo muerte neuronal, y sin embargo sobre las células gliales tendría un efecto mitogénico y de proliferación celular, explicando el por qué apenas se observan neuronas (muerte neuronal) y sí que existe un fenómeno de gliosis, ambos efectos producidos por el aumento de SP (Blanco, 2012). En la infancia, también se han encontrado concentraciones de SP y de los receptores NK1 en el síndrome de Rett, junto con factores de crecimiento nervioso, glutamato y endorfina (Dunn, 2001). La SP y en menor medida otras TK han sido implicadas como agentes causales en la generación de status epiléptico (Zachrisson, 1998). Se ha visto que, inyectada en el hipocampo de la rata, la SP disminuye el umbral de inicio de la actividad convulsiva, y de la misma manera el spantide II, un antagonista del receptor de la SP, es capaz de suprimir la actividad electroencefalográfica y prevenir el desarrollo de nuevas crisis en este grupo

de ratas (Liu, 1999). Además, se ha comprobado que los ratones carentes del gen *TAC-1* presentan una mayor resistencia a la aparición de convulsiones, siendo éstas de menor intensidad y duración y además con una recuperación más rápida tras las mismas, al mismo tiempo que se mostraban más protegidos de la destrucción de neuronas hipocampales, tanto por necrosis como por apoptosis (Liu, 1999). Estos datos demuestran el papel proconvulsivante de la SP y de su gen *TAC-1*. También se ha comprobado cómo el ácido valproico inhibe la expresión de receptores NK1 en astrocitos tanto de de rata como en humanos (Lieb, 2003). En un modelo experimental mediante inducción de convulsiones con ácido kaínico, Zarichsson et al pretrataron con el antagonista de los receptores NK1 CP-122,721-1 y comprobaron una disminución de la actividad convulsivante, así como una correlación positiva con la supervivencia neuronal (Zachrisson, 1998). Tanto la reducción de la actividad convulsivante como la neuroprotección observadas en ratones con defecto en el gen de la *TAC-1* están causados por la extinción de las vías de señalización mediadas por SP/NKA que son activadas por las convulsiones. Estos datos sugieren que estas TK son críticas para el control de la excitabilidad, las convulsiones y la vulnerabilidad del hipocampo (Liu, 1999). Todos estos datos indican que la SP causa convulsiones, y que estas convulsiones pueden ser prevenidas y/o tratadas con antagonistas de los receptores NK1, aunque su potencial aún no ha sido suficientemente investigado ni en animales ni en humanos (Muñoz y Coveñas, 2014). Kalinichev et al han llevado a cabo un estudio en modelo experimental animal evaluando la eficacia del antagonista del receptor NK1 vofopitant, solo o en combinación con diferentes drogas antiepilépticas, ya que muchos pacientes epilépticos se muestran resistentes a los anticomiciales, o bien no toleran las elevadas dosis que precisan para un correcto control. En este estudio encontraron que vofopitant no posee actividad anticonvulsivante per se, pero que es capaz de aumentar la

eficacia del antiepiléptico lamotrigina y de otros bloqueantes de los canales de sodio, efecto mediado por el receptor NK1. Además, las dosis utilizadas para vofopitant no mostraron efectos secundarios ni aumentaron los efectos secundarios producidos por altas dosis de lamotrigina. Es importante destacar que para obtener el efecto deseado era preciso que se bloqueara hasta el 99% de los receptores NK1, al igual que ocurre con otros antagonistas de los receptores NK1 estudiados en humanos. Los autores concluyen que se podrían obtener importantes beneficios en la práctica clínica al añadir antagonistas de los receptores NK1 a ciertas drogas antiepilépticas utilizadas en la actualidad (Kalinichev, 2010).

Las hemorragias intraventriculares (HIV) son una importante causa de lesión cerebral en el RNPT. Dicha lesión está generada tanto por la HIV como por sus complicaciones más frecuentes: la hidrocefalia posthemorrágica y la leucomalacia periventricular. Las HIV por lo general ocurren en el RNPT y su incidencia tiene una relación inversamente proporcional a la edad gestacional y el peso al nacer. A finales de los 70 la incidencia de la HIV se situaba entre el 40 y 50%, pero con el desarrollo de la neonatología y su especialización, se fue reduciendo hasta el 20-25% de finales de los 90. Esta curva de mejora se ha estancado en los últimos 10-15 años, en parte debido a la mejora en la supervivencia de los prematuros extremos, los cuales siguen estando en riesgo de HIV. En el RNPT, las HIV son debidas a dos particularidades patogénicas como la fragilidad de la matriz germinal y las alteraciones del flujo sanguíneo cerebral. La abundante y rica red de capilares situada en la matriz germinal, está formada por vasos de gran calibre pero con paredes vasculares muy finas. Esto hace que los vasos tengan poco soporte estructural y mayor riesgo de hemorragia que otras zonas del cuerpo humano. Este riesgo es debido a la inestabilidad hemodinámica del RNPT en las primeras horas de vida y la falta o deficiente autorregulación del flujo cerebral. Las

fluctuaciones en el flujo cerebral del RNPT están relacionadas con la HIV. Los RNPT son particularmente vulnerables a las variaciones del flujo cerebral ya que tienen muy mala autorregulación comparado con los RNT. Esto implica que cualquier variación de la tensión arterial del RNPT se traduce en una variación del flujo cerebral, dañando los frágiles capilares de la matriz germinal. Los plexos coroideos situados en el sistema ventricular cerebral, constituyen la principal fuente de secreción de LCR y representan la principal barrera para el control del entorno del SNC, separando así el LCR del flujo sanguíneo general. Lavezzi et al estudiaron los plexos coroideos en 84 estudios necrópsicos de sujetos de edades comprendidas entre las 17 semanas de edad gestacional y los 8 meses de vida postnatal, cuyo fallecimiento se produjo por causas tanto conocidas como desconocidas. Examinaron la citoarquitectura y los estadios de desarrollo del plexo coroideo para determinar las alteraciones morfológicas o funcionales en las muertes perinatales inexplicadas (síndrome de muerte súbita del lactante y síndrome de muerte súbita intrauterina inexplicada). Se observó una mayor incidencia de alteraciones histológicas e inmunohistoquímicas, entre ellas una sobreexpresión de SP y apoptosis, de manera significativa ( $p < 0,05$  con respecto a controles). También se observó correlación positiva entre el tabaquismo materno durante el embarazo y alteraciones neuropatológicas coroideas. Así, subrayan los efectos negativos que supone la exposición prenatal a la nicotina en el desarrollo del sistema nervioso y en particular de estructuras tan vulnerables en su desarrollo como es el plexo coroideo (Lavezzi, 2013). En el plano de lo teórico, mecanismos que podrían respaldar la posible participación de la SP en la hemorragia cerebral del neonato, tan frecuente en el período neonatal, serían los que rigen la llamada vasodilatación neurogénica. Así, se ha encontrado SP en terminaciones nerviosas sensoriales que rodean a los vasos sanguíneos de diferentes localizaciones anatómicas, por medio de las

cuales median dicha vasodilatación neurogénica (Furness, 1982). Además, en humanos voluntarios la administración intravenosa de eledoisina, agonista de la SP, produce hipertensión intracraneal, aumento de la frecuencia respiratoria y vasodilatación cutánea (Broccardo, 1995). La SP posee una importante acción vasodilatadora (Erspamer, 1981; Evans, 1988), y participa en la regulación del flujo sanguíneo en otras áreas del organismo, como la retina (Schmetterer, 2001), por lo que pensamos que del mismo modo podría influir activamente en la regulación del delicado flujo sanguíneo cerebral del RNPT, y quizás en un futuro se podría actuar farmacológicamente sobre sus receptores NK1 para prevenir la HIV tan frecuente en RNPT extremos.

La SP es uno de los neurotransmisores que intervienen en la transmisión de la señal dolorosa. Junto con sus receptores NK1, está presente en el asta dorsal de la médula espinal, donde al igual que la NKA desempeña un papel fundamental en la nocicepción. Así mismo, la SP contribuye a la transmisión dolorosa en procesos inflamatorios del SNC (Samsam, 2001). Los NP liberados desde las terminaciones nerviosas periféricas juegan un importante papel en los mecanismos de hiperalgesia que suceden después de un trauma nervioso periférico, contribuyendo a la generación del dolor neuropático, donde también interviene la SP (Jang, 2004). Durante el dolor crónico ya se describió hace varias décadas un aumento importante de la expresión de los receptores NK1 (Chahl, 1976; Lembeck, 1979; Furness, 1982; Lundberg, 1984). Los RN ingresados en las unidades de cuidados críticos, y más concretamente los RNPT, pueden percibir diferentes tipos de dolor, y frecuentemente su infradiagnóstico o terapia incorrecta pueden conducir a efectos fisiológicos adversos. Todas las sensaciones dolorosas agudas y recurrentes, o bien persistentes durante un cierto periodo de tiempo, experimentadas a tan temprana época de la vida, pueden conducir al desarrollo de un síndrome doloroso sin la adecuada intervención. Gadzhieva et al encontraron en RNPT

críticos con lesión hipóxico-isquémica del SNC niveles de SP plasmáticos del orden de hasta 14,46 ng/ml, confirmando el desarrollo de un síndrome doloroso (Gadzhieva, 2009). La administración intravenosa en jerbos de ciertos antagonistas de los receptores NK1 (L-733,060) tras la provocación de un estímulo doloroso causa la inhibición completa dosis-dependiente de la fase tardía de la respuesta nociceptiva (Rupniak, 1996). Sin embargo, hasta el momento los ensayos en humanos con varios antagonistas de los receptores NK1 (aprepitant, lanepitant, AV-608 y Cj-11,974) no han demostrado ser eficaces en el tratamiento del dolor en diferentes patologías (dolor neuropático, dolor visceral, dolor postoperatorio, osteoartritis y fibromialgia) (Borsook, 2012). El primer caso publicado en el que un antagonista de los receptores NK1 (en concreto, CP 99,994) es útil en el tratamiento del dolor se debe a Dionne et al, para el dolor dental postoperatorio (Dionne, 1998). Se ha sugerido que la ineficacia de ciertos antagonistas de los receptores NK1 para el tratamiento del dolor en ensayos clínicos en humanos podría deberse a una pobre penetración al SNC de estos compuestos a las dosis ensayadas (Hill, 2000; Muñoz y Coveñas, 2014), aunque este no fue el caso de aprepitant.

Sin duda una de las patologías del SNC del RN en las que más aplicabilidad podría tener el conocimiento de su relación con la SP son los procesos infecciosos /inflamatorios tipo meningitis/encefalitis/meningoencefalitis y sus complicaciones (colecciones purulentas, ventriculitis, fibrosis/tabicación/hidrocefalia...etc). La incidencia de meningitis es mayor en el período neonatal que en ninguna otra época de la vida, siendo más frecuente en la primera semana. Se considera, en general, que se asocia a la sepsis bacteriana en el 20-25% de las mismas. En la literatura se describe una frecuencia de meningitis bacteriana neonatal precoz que oscila entre 0,2-1‰ RN vivos (Klein, 1995). En la fase aguda, sus complicaciones más importantes son el edema

cerebral, hipertensión intracraneal progresiva, lesión cerebral parenquimatosa difusa, lesión cerebral parenquimatosa focal y ventriculitis. La SP es el principal mediador y desencadenante de la actividad neuroinmunomoduladora y de la respuesta inflamatoria neurogénica y no neurogénica (Fiebich, 2000; Harrison y Geppetti, 2001). El eje neuroinmune, es un camino bidireccional de comunicación entre los dos sistemas (O'Connor, 2004). El sistema SP/NK1 receptor regula los sistemas inmune clásico celular (Lieb, 1997) y humoral (Pascual, 1991). Las características de la inflamación neurogénica son el aumento de la permeabilidad vascular, la extravasación de plasma, la formación de edema y la infiltración de leucocitos (Holzer, 1988; Harrison y Geppetti, 2001). La SP no sólo es sintetizada y secretada por las células nerviosas, otras células de naturaleza no nerviosa, como son las células endoteliales (Linnik, 1989), los monocitos (Ho, 1997), macrófagos, células dendríticas, eosinófilos (Aliakbari, 1987), linfocitos (Lai, 1998), los mastocitos y células de Leydig (Chiwakata, 1991), las células de Hofbauer (Muñoz, 2013a) también expresan SP. Además, la expresión tanto de la SP como de los receptores NK1 está aumentada durante la inflamación (Weinstock, 1988), y este efecto puede ser bloqueado a su vez por antagonistas de los receptores NK1 (O'Connor, 2004). Esto ha llevado a la hipótesis de que la SP actúa no sólo como un mediador entre el sistema nervioso y el sistema inmune sino que actúa también de forma independiente de los nervios sensoriales a través de una regulación paracrina y/o autocrina para mediar las interacciones directas entre las células inmunes (Muñoz, 2011). En la revisión realizada por O'Connor TM et al (2004) se correlacionan elevados niveles de SP en sangre y aumento de expresión de los receptores NK1 en diversas enfermedades inflamatorias. Es conocido que la SP contribuye al reclutamiento de leucocitos en los procesos inflamatorios, aumenta la producción de citoquinas y favorece la quimiotaxis de los leucocitos a través de los receptores NK1. También se ha

demostrado que la SP induce la proliferación de linfocitos T (Nio, 1993) y que las células inmunes producen SP y también expresan su receptor NK1 (Lai, 1998). Por lo tanto, los linfocitos T humanos contienen ARNm preprotaquicinina, que codifica y produce SP (Lai, 1998). Por otra parte, se sabe que la SP a concentraciones nanomolares induce la síntesis de citoquinas proinflamatorias en células de la neuroglia y linfoides, aumentando la expresión de las IL-2 en células T (Calvo, 1992; Rameshwar, 1993) y estimulando la producción de IL-1, IL-6 y TNF- en astrocitos, microglías (Gitter, 1994; Lieb K, 1998; Fiebich, 2000) y macrófagos (Lotz, 1988). La SP podría controlar estos mediadores inflamatorios tanto a través del activador transcripcional NF-kB (factor de necrosis kB), que a su vez regularía muchas citoquinas inflamatorias (Lieb, 1997), como por otras vías independientes del NF-kB. En este sentido, Fiebich et al demostraron que la SP induce la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, implicada en diferentes fisiopatologías, a través de las vías MAPK, siendo estas vías un componente esencial para el control de la inflamación neurogénica dentro del SNC e independiente del NF-kB (Fiebich, 2000). Hegde et al, en estudios con ratones observaron que la SP ejerciendo su acción a través del receptor NK1 es responsable de la respuesta inflamatoria y el daño pulmonar en la sepsis y el bloqueo del receptor NK1 es protector de la lesión pulmonar en los ratones con sepsis polimicrobiana inducida (Hegde, 2007). La SP unida al receptor NK1 estimula y regula las citoquinas proinflamatorias (Williams, 2007) y la activación de mediadores inflamatorios en la sepsis depende principalmente de la activación del factor de transcripción NF-kB (Calzado, 2007). Además, la vía SP-NK1 receptor-NF-kB regula al alza las citoquinas proinflamatorias en las células epiteliales de colon humanos (a través de PKC) (Koon, 2005), en los monocitos (a través de ERK) (Chernova, 2009), en los macrófagos y en las células dendríticas murinas (Marriott, 2000), en las células cebadas humanas (a

través de la IP3 quinasa, PKA) (Kulka, 2008), en los mastocitos peritoneales de rata (a través de MAPKs) (Azzolina, 2003), en los linfocitos T humanos (Guo, 2002), en las células embrionarias de riñón humano (a través de PKC, ERK) (Lai, 2008) y en preadipocitos mesentéricos humanos (Karagiannides, 2006). Existe la posibilidad de que la acción de la SP a través del receptor NK1 inicie la cascada de señalización inflamatoria que está mediada por PKCa y conduce a la activación de NF-kB y AP-1 y la modulación de más mediadores proinflamatorios en la sepsis polimicrobiana. Además, esta cascada inflamatoria iniciada por la SP es bloqueada a través de un antagonista del receptor NK1 (SR140333) (Hegde, 2010).

Todos estos datos nos llevan a la idea de que la SP, a través del receptor NK1, podría estar involucrada en la etiopatogenia de diferentes desórdenes infeccioso/inflamatorios, iniciando, acelerando o manteniendo dichos procesos en patologías asociadas al SNC, en particular del RN. Muñoz y Coveñas proponen a la SP como biomarcador de la inflamación ya que estimula la producción de interleuquinas a través de distintas vías, como la IL-6, participando en la regulación de procesos inflamatorios (Muñoz y Coveñas, 2014). Dentro del interés que suscita la molécula como posible iniciador y mediador inflamatorio, habría que destacar la disponibilidad de diferentes antagonistas selectivos de los receptores NK1, del tipo no peptídico, los cuales son candidatos idóneos para bloquear los efectos de la SP en la práctica clínica, si se llegara a demostrar más adelante que efectivamente ésta desempeña un papel importante en los procesos inflamatorios que afectan al SNC del RN. La implicación de la SP y su receptor NK1 en la meningitis bacteriana ya ha sido demostrada. En la rata, la SP induce vasodilatación arteriolar de la pia madre durante la meningitis neumocócica, y el tratamiento con el antagonista del receptor NK1 “Spantide” es capaz de atenuar de manera significativa la vasodilatación arteriolar mencionada en este tipo de meningitis

(Pfister, 1995). La microglía expresa receptores NK1 y la SP es capaz de elevar de manera significativa productos proinflamatorios de tipo prostanoide inducidos por agentes bacterianos en cultivos aislados de estas células (Chauhan, 2008). La interacción del sistema SP/NK1 receptor es un componente esencial de la iniciación y/o progresión in vivo de la inflamación del SNC iniciada en concreto por dos agentes bacterianos clínicamente tan relevantes como son *Neisseria meningitidis* y *Borrelia burgdorferi*. Tanto la elevación en la producción de citoquinas proinflamatorias como la disminución de la producción de citoquinas inmunosupresoras se ven marcadamente atenuadas en ratones que carecen genéticamente de la expresión del receptor NK1, y lo mismo ocurre en ratones tratados con antagonistas de los receptores NK1 (Chaughan, 2008). Igualmente se ha demostrado en un modelo in vivo de meningitis neumocócica que la SP también es capaz de incrementar la respuesta inflamatoria glial al Gram positivo *Streptococcus pneumoniae*, y que la interacción SP/NK1 receptor de nuevo juega un papel fundamental en el desarrollo de la inflamación del SNC (Chaughan, 2011). Además, actuar sobre el receptor NK1 no sólo previene el desarrollo del daño por inflamación cuando los antagonistas son administrados profilácticamente, sino que también son capaces de limitar o revertir la neuroinflamación asociada a una meningitis neumocócica ya establecida, con intención terapéutica (Chaughan, 2011). La intervención terapéutica con antagonistas de los receptores NK1 revierte la gliosis y desmielinización asociadas a la infección incluso en ausencia de cambios en la carga bacteriana presente en SNC (Chaughan, 2011). Todos estos datos sugieren que el sistema SP/NK1 receptor desempeña un papel importante en la patología del SNC, y por lo tanto el receptor NK1 podría llegar a ser una buena diana terapéutica y una excelente estrategia de tratamiento mediante el empleo de sus antagonistas (Muñoz y Coveñas, 2014).



# **VI. RESUMEN**

La SP es el principal mediador y desencadenante de la actividad neuroinmunomoduladora y de la respuesta inflamatoria neurogénica y no neurogénica. El eje neuroinmune es un camino bidireccional de comunicación entre los dos sistemas. La SP se encuentra presente en la práctica totalidad de nuestro organismo, y ejerce múltiples funciones tanto fisiológicas como patológicas, de manera directa o mediante el control y modulación de una gran variedad de sistemas bioquímicos, ya que puede actuar de manera autocrina, paracrina, o endocrina en su función de verdadera hormona. El sistema SP/NK1 receptor regula los sistemas inmune clásico celular y humoral, siendo el mediador y desencadenante principal de la respuesta inflamatoria, por lo que al conocer sus valores normales en LCR, podríamos tener una referencia sobre la desviación de la normalidad de dichos valores en diferentes procesos patológicos que afectan al SNC del RN y quizás puedan ser útiles para el diagnóstico precoz de algunos de estos procesos o incluso se pueda llegar a actuar sobre estas patologías si se llega a demostrar la eficacia de la utilización de antagonistas de los receptores NK1 como tratamiento apropiado.

Hasta ahora no hemos podido disponer de estos valores normales principalmente por la dificultad ética que supone la obtención de la muestra de LCR, obtenido de manera obligada a través de la técnica de PL, en pacientes menores y en teoría libres de patología. En nuestro caso hemos superado este hándicap mediante la aplicación de estrictos criterios de inclusión y exclusión para RN con indicación médica de realización de PL por diferentes factores de riesgo. Hemos llevado a cabo la determinación de SP mediante la técnica de ELISA en 126 muestras procedentes de 63 RN menores de 30 días de vida libres de patología del SNC.

Con este estudio los valores normales de SP en LCR de RN, determinados mediante técnica de ELISA, quedan establecidos en  $576,53 \pm 346,3$  pg/ml, o lo que es lo mismo  $428,01 \pm 257$  fmol/ml.

Las patologías que afectan al SNC del RN en las que el conocimiento de estos valores normales podrían tener aplicabilidad son tan variadas como las que se citan a continuación: malformaciones congénitas, hipoxia/isquemia perinatal y encefalopatía hipóxico-isquémica, retinopatía de la prematuridad, síndrome convulsivo, dolor y procesos infecciosos que afectan al SNC.

Conociendo ya cuáles son estos valores normales, se abre un amplísimo campo para la investigación, que podría conseguir importantes avances en el área de la Neonatología, y muy especialmente en los cuidados críticos en la atención de RN vulnerables.

## **VII. CONCLUSIONES**

- 1- La SP está presente en todas las muestras estudiadas LCR de RN.
2. La presencia de SP en LCR confirma la importancia de este NP en la fisiología del SNC.
- 3- El método ELISA es fiable para la determinación de la SP en LCR ya que no hay diferencias significativas entre los valores de dos muestras del mismo individuo en sesenta y tres casos.
- 4- Los niveles de SP en LCR de RN se hallan en concentraciones pg/ml, y estos valores quedan establecidos en  $576,53 \pm 346,3$  pg/ml ( $428,01 \pm 257$  fmol/ml).
- 5- Los niveles normales de SP en LCR de RN establecen las bases para estudiar las implicaciones de SP con las diferentes patologías del SNC que afectan especialmente al RN.
- 6- En base a las implicaciones fisiopatológicas de la SP, en un futuro probablemente se podrá utilizar en la práctica clínica como un biomarcador precoz de inflamación e infección.
- 7- El posible uso de la SP como biomarcador, incluiría la posibilidad del uso de los antagonistas de los receptores NK1 como intervención terapéutica, ampliándose el concepto de biomarcador clásico pues también incluiría el uso de éstos como dianas terapéuticas, surgiendo el concepto de “biomarcador terapéutico”.
- 8- Los niveles normales de SP en LCR pueden ayudar a la comprensión de los fenómenos fisiológicos del SNC donde se halla implicada la SP. Y establecen las bases para un futuro abordaje de la fisiopatología en la que está involucrada la SP.



# **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

Abbott, N.J., 2000. Inflammatory mediators and modulation of blood –brain barrier permeability. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20, 131–147.

Abbott, N.J., 2002. Astrocyte – endothelial interactions and blood –brain barrier permeability. *J. Anat.* 200, 629– 638.

Acher R, Chauvet J, Chauvet MT, 1995. Man and the chimaera. In: Ivell, R., Russell, J.A. (Eds.) *Oxytocin: cellular and molecular approaches in medicine and research. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Plenum Press, New York, pp. 615–627.

Adinolfi M, Beck SE, Haddad SA, Seller MJ. Permeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier to plasma proteins during foetal and perinatal life. *Nature* 1976;259:140-1.

Advenier C, Joos G, Molimard M, Lagente V, Pauwels R. Role of tachykinins as contractile agonists of human airways in asthma. *Clin Exp Allergy*, 1999;29(5):579-584.

Afan AM, Broome CS, Nicholls SE, Whetton AD, Miyan JA. Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine haemopoietic system. *Br J Haematol*, 1997;98(3):569-577.

Akopian TN, Arzumanian AM, Agadzhanian AG, and Arutiunian AA. Synaptosomal degradation of neuropeptides. *Bioorg Khim*, 1991;17(12):1589-1604.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Walter P. (2008). *Molecular Biology of The Cell* (5 ed.). New York: Garland Science.

Aliakbari J, Sreedharan SP, Turck CW, Goetzl EJ. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:1440-5.

Allen JM, Hoyle NR, Yeats JC, Ghatei MA, Thomas DG, Bloom SR. Neuropeptides in neurological tumours. *J Neurooncol*, 1985;3(3):197-202.

Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernandez M, Martin JD, & Candenas ML. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem*, 2004;11(15):2045-2081.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997;25(17):3389-3402.

Altuntas SC, Ipekci T, Yakupoglu G, Erin N. Changes in urine levels of substance P, vasoactive intestinal peptide and calcitonin-gene-related peptide in patients with urinary tract infections. *Peptides* 2014;56:151-5.

Aluise CD, Sowell RA, Butterfield DA. Peptides and Proteins in Plasma and Cerebrospinal Fluid as Biomarkers for the Prediction, Diagnosis, and Monitoring of Therapeutic Efficacy of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:549-58.

Amadoro G, Pieri M, Ciotti MT, Carunchio I, Canu N, Calissano P, Severini C. Substance P provides neuroprotection in cerebellar granule cells through Akt and MAPK/Erk activation: evidence for the involvement of the delayed rectifier potassium current. *Neuropharmacology*, 2007;52(6):1366-1377.

Anastasi A, Erspamer V, Cei JM. Isolation and Amino Acid Sequence of Physalaemin, the Main Active Polypeptide of the Skin of *Physalaemus Fuscumaculatus*. *Arch Biochem Biophys*, 1964;108:341-348.

Anastasi A, Montecucchi P, Erspamer V, Visser J. Amino acid composition and sequence of kassinin, a tachykinin dodecapeptide from the skin of the African frog *Kassina senegalensis*. *Experientia*, 1977;33(7):857-858.

Anichini M, Cesaretti S, Lepori M, Maddali Bongi S, Maresca M, Zoppi M. Substance P in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rev Rhum Engl Ed*, 1997;64(1):18-21.

Annunziata, P., Cioni, C., Toneatto, S., Paccagnini, E., 1998. HIV-1 gp120 increases the permeability of rat brain endothelium cultures by a mechanism involving substance P. *AIDS* 12, 2377–2385.

Ansaloni L, Balzani C, Falaschi F, Paze E. Post-spinal headache after dural puncture with perpendicular or horizontal needle bevel direction: a randomized controlled trial in an African rural hospital. *Trop Doct*. 2000;30:167-9.

Aronica E, Sisodiya SM, Gorter JA. Cerebral expression of drug transporters in epilepsy. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;64(10):919-29.

Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Ekman R, Olesen J. Plasma levels of substance P, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide y patients with chronic tension - type headache. *Pain* 1999;83:541-547.

Azzolina A, Bongiovanni A and Lampiasi N. Substance P induces TNF- and IL-6 production through NF B in peritoneal mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1643:75-83.

Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Tanaka Y, Hamazaki Y, Shimizu K, & Katayama I. Substance P induced preprotachykinin-a mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002;127(4):316-321.

Baertschi AJ, Zingg HH, Dreifuss JJ. Enkephalins, substance P, bradykinin and angiotensin II: differential sites of action on the hypothalamoneurohypophysial system. *Brain Res*, 1981;220(1):107-119.

Baeten KM, Akassoglou K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Dev Neurobiol* 2011;71:1018 –1039.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview. Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004;16:1-13.

Bandari PS, Qian J, Yehia G, Seegopaul HP, Harrison JS, Gascon P, Rameshwar P. Differences in the expression of neurokinin receptor in neural and bone marrow mesenchymal cells: implications for neuronal expansion from bone marrow cells. *Neuropeptides*, 2002;36(1):13-21.

Bang R, Sass G, Kiemer AK, Vollmar AM, Neuhuber WL, Tiegs G. Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003;305(1):31-39.

Banks WA, Kastin AJ. Peptides and the blood-brain barrier: Lipophilicity as a predictor of permeability. *Brain Res Bull* 1985;15:287-292.

Bannon MJ, Poosch MS, Haverstick DM, Mandal A, Xue IC, Shibata K, Dragovic LJ. Preprotachykinin gene expression in the human basal ganglia: characterization of mRNAs and pre-mRNAs produced by alternate RNA splicing. *Brain Res Mol Brain Res*, 1992;12(1-3):225-231.

Barem JM.; Brennan, JA.; LB; Rothrock, SG. *Pediatric Emergency Medicine*. Philadelphia:Saunders Elsevier; 2008.

Bauer HC, Krizbai IA, Bauer H, Traweger A. “You shall not pass”-tight junctions of the blood brain barrier. *Front Neurosci* 2014;8:392.

Beal MF, Mazurek MF. Substance P-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Neurology*, 1987;37(7):1205-1209.

Beaujouan JC, Torrens Y, Saffroy M, Kemel ML, Glowinski J. A 25 year adventure in the field of tachykinins. *Peptides*, 2004;25(3):339-357.

Beaujouan JC, Saffroy M, Torrens Y, Sagan S, Glowinski J. Pharmacological characterization of tachykinin septide-sensitive binding sites in the rat submaxillary gland. *Peptides*, 1999;20(11):1347-1352.

Begley DJ, Pontikis CC, Scarpa M. Lysosomal storage diseases and the blood-brain barrier. *Curr Pharmaceut Des* 2008;14:1566 –1580.

Behrman, RE.; Kliegman, R.; Jenson, HB. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17. Philadelphia: Saunders; 2004.

- Benarroch EE. Blood-brain barrier. Recent developments and clinical correlations. *Neurology* 2012;78:1268-76.
- Benizri E, Ginouves A, Berra E. The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(7-8):1133-49.
- Benjannet, S., Seidah, N. G., Routhier, R., & Chretien, M. (1980). A novel human pituitary peptide containing the gamma-MSH sequence. *Nature*, 285(5764), 415-416.
- Benuck M, & Marks N. Enzymatic inactivation of substance P by a partially purified enzyme from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1975;65(1):153-160.
- Bergström T, Larson H, Lincoln K, Winberg J. Studies of urinary tract infections in infancy and childhood: XII. Eighty consecutive patients with neonatal infection. *J Pediatr* 1972;80:858–66.
- Bertaccini G. Active polypeptides of nonmammalian origin. *Pharmacol Rev*, 1976;28(2):127-177.
- Betancur C, Azzi M, Rostene W. Nonpeptide antagonists of neuropeptide receptors: tools for research and therapy. *Trends in Physiological Science* 1997;18:372–386.
- Bigioni M, Benzo A, Irrissuto C, Maggi CA, Goso C. Role of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor antagonism on the growth of human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Anticancer Drugs*, 2005;16(10):1083-1089.
- Björklund A, Hökfelt T, and Kuhar MJ. (1992). *Neuropeptides in the CNS (Handbook of Chemical Neuroanatomy)* (Vol. 11). New York: Elsevier Science.
- Black KL, Baba T, Pardridge WM. Enzymatic barrier protects brain capillaries from leukotriene C4. *J Neurosurg* 1994;81:745–751.
- Blalock JE. Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock. *J Exp Med*, 2002;195(6):F25-28.
- Blanco Martínez, B. (2012). *La SP y el RNK1 en la esclerosis mesial temporal*. (MD), Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Boado RJ, Zhang Y, Pardridge WM, Humanization of anti—human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. *Biotechnol Bioeng* 2007;96:381-391.
- Bockmann S, Seep J, Jonas L. Delay of neutrophil apoptosis by the neuropeptide substance P: involvement of caspase cascade. *Peptides*, 2001;22(4):661-670.
- Bohm SK, Khitin LM, Smeekens SP, Grady EF, Payan DG, Bunnnett NW. Identification of potential tyrosine-containing endocytic motifs in the carboxyl-tail and seventh transmembrane domain of the neurokinin 1 receptor. *J Biol Chem*, 1997;272(4):2363-2372.

- Bondy B, Baghai TC, Minov C, Schule C, Schwarz MJ, Zwanzger P, Moller HJ. Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. *Biol Psychiatry*, 2003;53(6):538-542.
- Boon JM, Abrahams PH, Meiring JH, Welch T. Lumbar puncture: anatomical review of a clinical skill. *Clin Anat*. 2004;17:544-53.
- Bouras C, Vallet PG, Hof PR, Charnay Y, Golaz J, Constantinidis J. Substance P immunoreactivity in Alzheimer disease: A study in cases presenting symmetric or asymmetric cortical atrophy. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1990;4(1):4-34.
- Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW. Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 2000 Mar;21(3):109-17.
- Brener S, Gonzalez-Moles MA, Tostes D, Esteban F, Gil-Montoya JA, Ruiz- Avila I, Muñoz M. A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2009;29(6):2323- 2329.
- Broccardo M, Improta G, Severini C. Parallel bioassay of PG-SPI, an amphibian acidic SP-like peptide, mammalian basic substance P, and neurokinins A and B on in vitro and in vivo test systems. *Peptides*, 1995;16(4):609-614.
- Brogden KA, Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol*, 2005;6(6):558-564.
- Brown ER, Roth KA, & Krause JE. Sexually dimorphic distribution of substance P in specific anterior pituitary cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991;88(4):1222-1226.
- Brownson EA, Abbruscato TJ, Gillespie TJ, Hruby VJ, Davis TP. Effect of peptidases at the blood brain barrier on the permeability of enkephalin. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:675– 680.
- Brownstein MJ, Mezey E, 1986. Multiple chemical messengers in hypothalamic magnocellular neurons. In: Hökfelt, T., Fuxe, K., Pernow, B. (Eds.) *Progress in Brain Research*. Elsevier, Amsterdam, pp. 161–168.
- Bueno-Rodríguez MI (2014). Niveles de sustancia P en sangre de cordón de neonatos sanos a término. (MD), Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Burcher E, Alouan LA, Johnson PR, Black JL. Neuropeptide gamma, the most potent contractile tachykinin in human isolated bronchus, acts via a 'nonclassical' NK2 receptor. *Neuropeptides*, 1991;20(2):79-82.
- Burcher E, Buck SH. Multiple tachykinin binding sites in hamster, rat and guinea-pig urinary bladder. *Eur J Pharmacol*, 1986;128(3):165-177.

Caberlotto L, Hurd YL, Murdock P, Wahlin JP, Melotto S, Corsi M, Carletti R. Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci*, 2003;17(9):1736-1746.

Cahill CM, Coderre TJ. Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre- or post-treatment with a neurokinin-1 antagonist. *Pain* 2002;95:277-285.

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

Calzado MA, Bacher S, Schmitz ML. NF- $\kappa$ B inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Current Medicinal Chemistry* 2007;14:367-376.

Campbell DE, Raftery N, Tustin R III, Tustin NB, DeSilvio ML, Cnaan A, Aye PP, Lackner AA, and Douglas SD. Measurement of Plasma-Derived Substance P: Biological, Methodological, and Statistical Considerations. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1197-1203.

Campbell DE, Bruckner P, Tustin NB, Tustin R III and Douglas SD. Novel Method for Determination of Substance P Levels in Unextracted Human Plasma by Using Acidification. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:594-6.

Candenas ML, Cintado CG, Pennefather JN, Pereda MT, Loizaga JM, Maggi CA, Pinto FM. Identification of a tachykinin NK(2) receptor splice variant and its expression in human and rat tissues. *Life Sci*, 2002;72(3):269-277.

Carpenter LL, Bayat L, Moreno F, Kling MA, Price LH, Tyrka AR, Kinkead B, Owens MJ, Nemeroff CB. Decreased cerebrospinal fluid concentrations of substance P in treatment-resistant depression and lack of alteration after acute adjunct vagus nerve stimulation therapy. *Psychiatry Research* 2008;157(1-3):123-129.

Cascieri MA, Huang RR, Fong TM, Cheung AH, Sadowski S, Ber E, Strader CD. Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. *Mol Pharmacol*, 1992;41(6):1096-1099.

Casini G, Dal Monte M, Fornai F, Bosco L, Willems D, Yang Q, Zhou ZJ, Bagnoli P. Neurokinin 1 receptor expression and substance P physiological actions are developmentally regulated in the rabbit retina. *Neuroscience* 2004;124(1):147-160.

Castel MN, Morino P, Frey P, Terenius L, Hokfelt T. Immunohistochemical evidence for a neurotensin striatonigral pathway in the rat. *Neuroscience*, 1993;55:833-847.

Castro-Obregón S, del Rio G, Chen SF, Swanson RA, Frankowski H, Rao RV, et al. A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic form of programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 2002;9:807-817.

Castro del Pozo S (1996). *Manual de Patología General* (5ª Ed.). Barcelona: Masson.

Catalina E, Dal Monte M, Gangitano D, Lucattelli M, Fineschi S, Bosco L, Bagnoli P, Casini G. Expression of substance P, neurokinin 1 receptors (NK1) and neurokinin 3 receptors in the developing mouse retina and in the retina of NK1 knockout mice. *Neuroscience* 2006;138(2):487-499.

Ceballos, M. (1997). Péptidos y neurotransmisores. In D. Andreu & L. Rivas (Eds.), *Péptidos en Biología y Biomedicina* (pp. 463-478). Madrid: CSIC.

Chahl LA, Ladd RJ. Local oedema and general excitation of cutaneous sensory receptors produced by electrical stimulation of the saphenous nerve in the rat. *Pain* 1976;2:25-34.

Champagne DE, & Ribeiro JM. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994;91(1):138-142.

Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol*, 1971;232(29):86-87.

Chapman RW, Hey JA, McLeod R, Minnicozzi M, Rizzo C. Tachykinins in the lungs. *Drug News Perspect*, 1998;11(8):480-489.

Charlton CG, Helke CJ. Ontogeny of substance P receptors in rat spinal cord: quantitative changes in receptor number and differential expression in specific loci. *Brain Res* 1986;394:81-91.

Chauhan VS, Sterka DG Jr, Gray DL, Bost KL, Marriott I. Neurogenic exacerbation of microglial and astrocyte responses to *Neisseria meningitidis* and *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 2008;180:8241–8249.

Chauhan VS, Kluttz JM, Bost KL, Marriott I. Prophylactic and therapeutic targeting of the neurokinin-1 receptor limits neuroinflammation in a murine model of pneumococcal meningitis. *J Immunol* 2011;186:7255–7263.

Chavolla-Calderon M, Bayer MK, Fontan JJ. Bone marrow transplantation reveals an essential synergy between neuronal and hemopoietic cell neurokinin production in pulmonary inflammation. *J Clin Invest*, 2003;111(7):973-980.

Checler, F. (1993). Neuropeptide-degrading peptidases. In S. H. Parvez, M. Naoi, T. Nagatsu & S. Parvez (Eds.), *Methods in Neuropeptide Research* (pp. 375-418). Amsterdam: Elsevier.

Chen Y, McCarron, RM, Azzam N, Bembry J, Reutzler C, Lenz FA, Spatz, M. Endothelin-1 and nitric oxide affect human cerebrovascular endothelial responses and signal transduction. *Acta Neurochir., Suppl.* 2000;76:131–135.

Chernova I, Lai JP, Li H et al. Substance P (SP) enhances CCL5-induced chemotaxis and intracellular signaling in human monocytes, which express the truncated neurokinin-1 receptor (NK1R). *Journal of Leukocyte Biology* 2009;85:154-164.

Chizh BA, Gohring M, Troster A, Quartey GK, Schmelz M, Koppert W. Effects of oral pregabalin and aprepitant on pain and central sensitization in the electrical hyperalgesia model in human volunteers. *Br J Anaesth*, 2007;98(2):246-254.

Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R. Tachykinin (Substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology* 1991;128:2441-2448.

Chordas C. Post-dural puncture headache and other complications after lumbar puncture. *J Pediatr Oncol Nurs* 2001;18:244-259.

Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex, MD, Martin RJ. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*, 2000;106(4):713-722.

Ciucci A, Palma C, Manzini S, Werge TM. Point mutation increases a form of the NK1 receptor with high affinity for neurokinin A and B and septide. *Br J Pharmacol*, 1998;125(2):393-401.

Clark JW, Senanayake PS, Solomon GD, Gallagher C. Substance P: Correlation of CSF and plasma levels. *Headache* 1994;34:261-264.

Clark JW, Solomon GD, Senanayake PD, Gallagher C. Substance P concentration and history of headache in relation to postlumbar puncture headache: towards prevention. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60(6):681-683.

Coisne C, Engelhardt B. Tight junctions in brain barriers during central nervous system inflammation. *Antioxid Redox Sig* 2011;15:1285–1303.

Corbally N, Powell D, Tipton KF. The binding of endogenous and exogenous substance-P in human plasma. *Biochem. Pharmacol* 1990;39:1161-1166.

Cui QL, Yung WH, Chen L. Effects of substance P on neuronal firing of pallidal neurons in parkinsonian rats. *Neurosci Res*, 2008;60(2):162-169.

Cunin P, Caillon A, Corvaisier M, Garo E, Scotet M, Blanchard S, Jeannin P. The tachykinins substance P and hemokinin-1 favor the generation of human memory Th17 cells by inducing IL-1beta, IL-23, and TNF-like 1A expression by monocytes. *J Immunol*, 2011;186(7):4175-4182.

D'Orleans-Juste P, Dion S, Mizrahi J, Regoli D. Effects of peptides and non-peptides on isolated arterial smooth muscles: role of endothelium. *Eur J Pharmacol*, 1985;114(1):9-21.

Dale H. Pharmacology and Nerve-endings (Walter Ernest Dixon Memorial Lecture): (Section of Therapeutics and Pharmacology). *Proc R Soc Med*, 1935;28(3):319- 332.

Daneman R. The Blood–Brain Barrier in Health and Disease. *Ann Neurol* 2012;72:648–672.

Dauchy S, Dutheil F, Weaver RJ, et al. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J Neurochem* 2008;107:1518–1528.

De Biasi S, & Rustioni A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988;85(20):7820-7824.

De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, Hunt SP. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature*, 1998;392(6674):394-397.

De Felipe C, Pinnock RD, and Hunt SP. Modulation of chemotropism in the developing spinal cord by substance P. *Science*, 1995;267(5199):899-902.

DeFelipe, J. (2005). Cajal y sus dibujos: ciencia y arte. In A. Martín Araguz (Ed.), *Arte y Neurología* (pp. 213-230). Madrid: Saned.

DeFelipe, J. (2002). Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res*, 136, 215-238.

Deng H, Luo F. The effect of NK-1 tachykinin receptor antagonist on hypoxia induced hepatic function injury and hepatocellular apoptosis in rats. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2011 Oct;28(5):992-6.

Dery O, Defea KA, Bunnett NW. Protein kinase C-mediated desensitization of the neurokinin 1 receptor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001;280(5):C1097-1106.

Deutch AY, Zahm DS. The current status of neurotensin-dopamine interactions. *Annals of the NY Academy of Science*, 1992;668:232–252.

DeVane CL. Substance P: a new era, a new role. *Pharmacotherapy*, 2001;21(9):1061-1069.

Diez M, Koistinaho J, Games D, Hokfelt T. Neuropeptides in hippocampus and cortex in transgenic mice overexpressing V717F b-amyloid precursor protein. *Society of Neuroscience Abstracts* 1999;25:2053.

Dionne RA, Max MB, Gordon SM, Parada S, Sang C, Gracely RH, Sethna NF, MacLean DB. The substance P receptor antagonist CP-99,994 reduces acute postoperative pain. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:562–568.

Dobrescu G. Intercellular communication. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 1998;102(3-4):17-24.

Dooley CT, Chung NN, Wilkes BC, Schiller PW, Bidlack JM, Pasternak GW, Houghten RA. An all D-amino acid opioid peptide with central analgesic activity from a combinatorial library. *Science* 266, 2019–2022.

- Dooner JJ. Needle bevel direction and postlumbar puncture headache. *Anesthesiology*. 1989;71:623-4.
- Douglas SD, Cnaan A, Lynch KG, Benton T, Zhao H, Gettes DR, Evans DL. Elevated substance P levels in HIV-infected women in comparison to HIV-negative women. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2008;24(3):375-378.
- Douglas SD, Ho WZ, Gettes DR, Cnaan A, Zhao H, Leserman J, Evans DL. Elevated substance P levels in HIV-infected men. *AIDS*, 2001;15(15):2043-2045.
- Douglas SD, Leeman SE. Neurokinin-1 receptor: functional significance in the immune system in reference to selected infections and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 2011;1217:83-95.
- Doyle L, Colletti JE. Pediatric procedural sedation and analgesia. *Pediatr Clin North Am* 2006;53:279-292.
- Drapeau G, D'Orleans-Juste P, Dion S, Rhaleb NE, Rouissi NE, Regoli D. Selective agonists for substance P and neurokinin receptors. *Neuropeptides*, 1987;10(1):43-54.
- Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *Journal of Biological Chemistry*, 1953;205:949–957.
- Ducroc R, Rubio S, Garzon B, Brunel-Riveau B, Couraud JY. Immunoreactive substance P and calcitonin-gene-related peptide (CGRP) in rat milk and in human milk and in infant formulas. *Am J Clin Nutr* 1995;62(3):554-8.
- Dunn HG. Importance of Rett syndrome in child neurology. *Brain Dev* 2001;23 Suppl 1:S38-43.
- Durieux C.R.-G, Bergeron F, Ducos B, Corringer PJ, Roques BP. (3H)pBC 264, a suitable probe for studying CCK-B receptors: binding characteristics in rodent brains and comparison with (3H)SNF 8702. *Molecular Pharmacology* 1992;41:1089–1095.
- Eberlin M, Muck T, Michel MC. A comprehensive review of the pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical effects of the neutral endopeptidase inhibitor racecadotril. *Front Pharmacol*, 2012;3:93.
- Eglezos A, Andrews PV, Boyd RL, Helme RD. Modulation of the immune response by tachykinins. *Immunol Cell Biol*, 1991;69 ( Pt 4):285-294.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*, 2000;52(4):595-638.
- Elferink RPJO and Zadina J. MDR1 P-glycoprotein transports endogenous opioid peptides. *Peptides* 2001;22(12):2015–2020.

- Ellis JL, Udem BJ. Pharmacology of non-adrenergic, non-cholinergic nerves in airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol*, 1994;7(4):205-223.
- Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*. 2009;31(4):497-511.
- Ernst OP, & Bartl FJ. Active states of rhodopsin. *Chembiochem*, 2002;3(10):968-974.
- Erspamer V. [Not Available]. *Farmacol*, 1949;4(2):179-181.
- Erspamer V. The tachykinin peptides family. *Trends in Neurosciences*, 1981;4:267-269.
- Erspamer V, Anastasi A. Structure and pharmacological actions of eledoisin, the active endecapeptide of the posterior salivary glands of *Eledone*. *Experientia*, 1962;18:58-59.
- Esteban F, Gonzalez-Moles MA, Castro D, Martin-Jaen Mdel M, Redondo M, Ruiz-Avila I, Muñoz M. Expression of substance P and neurokinin-1- receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression. *Histopathology*, 2009;54(2).258-260.
- Evans TW, Dixon CM, Clarke B, Conradson TB, Barnes PJ. Comparison of neurokinin A and substance P on cardiovascular and airway function in man. *Br J Clin Pharmacol*, 1988;25(2):273-275.
- Fabene PF, Navarro Mora G, Martinello M, et al. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat Med* 2008;14:1377–1383.
- Fan TP, Hu DE, Guard S, Gresham GA, Watling KJ. Stimulation of angiogenesis by substance P and interleukin-1 in the rat and its inhibition by NK1 or interleukin-1 receptor antagonists. *Br J Pharmacol* 1993;110:43-49.
- Fehder WP, Ho WZ, Campbell DE, Tourtellotte WW, Michaels L, Cutilli JR, Uvaydova M, and Douglas SD. Development and evaluation of a chromatographic procedure for partial purification of substance P with quantitation by an enzyme immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:303-307.
- Feigin, RD.; Cherry, JD.; Demmler, GJ.; Kaplan, SL. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 5. Philadelphia: Saunders; 2004.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Richardson EP Jr., Bird ED, Martin JB. Topography of enkephalin, substance P and acetylcholinesterase staining in Huntington's disease striatum. *Neurosci Lett*, 1986;71(3):283-288.
- Ferrell WR, Russell NJW. Extravasation in the knee induced by antidromic stimulation of articular C fibre afferents of the anaesthetized cat. *J Physiol* 1986;376:407-416.
- Fiebich BL, Schleicher S, Butcher RD, Craig A, Lieb K. The neuropeptide substance P activates p38 mitogen-activated protein kinase resulting in IL-6 expression independently from NF-kappa B. *J Immunol*, 2000;165(10).5606-5611.

- Fielkow S, Reuter S, Gotoff SP. Cerebrospinal fluid examination in symptom-free infants with risk factors for infection. *J Pediatr* 1991;119:971-3.
- Fink BR, Walker S. Orientation of fibers in human dorsal lumbar dura mater in relation to lumbar puncture. *Anesth Analg*. 1989;69:768-72.
- Fioramonti J, Gaultier E, Toulouse M, Sanger GJ, Bueno L. Intestinal anti-nociceptive behaviour of NK3 receptor antagonism in conscious rats: evidence to support a peripheral mechanism of action. *Neurogastroenterol Motil*, 2003;15(4):363-369.
- Flashner E, Raviv U, Friedler A. The effect of tachykinin neuropeptides on amyloid beta aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011;407(1):13-17.
- Fleisher, GR.; Ludwig, S.; Henretig, F. *Textbook of Pediatric Emergency Medicine*. 5. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- Folkers K, Feng D M, Asano N, Hakanson R, Weisenfeld-Hallin Z, and Leander S. Spantide II, an effective tachykinin antagonist having high potency and negligible neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990;87(12):4833-4835.
- Folkers K, Hakanson R, Horig J, Xu JC, and Leander S. Biological evaluation of substance P antagonists. *Br J Pharmacol*, 1984;83(2):449-456.
- Folkers K, Horig J, Rampold G, Lane P, Rosell S, and Bjorkroth U. Design and synthesis of effective antagonists of substance P. *Acta Chem Scand B*, 1982;36(6):389-395.
- Fong TM, Anderson SA, Yu H, Huang RR, Strader CD. Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. *Mol Pharmacol*, 1992;41(1):24-30.
- Fong TM, Yu H, Strader CD. Molecular basis for the species selectivity of the neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and RP67580. *J Biol Chem*, 1992;267(36):25668-25671.
- Formenti F, Constantin-Teodosiu D, Emmanuel Y, Cheeseman J, Dorrington KL, Edwards LM, et al. Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor". *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(28):12722-7.
- Frank, G.; Shah, SS.; Catalozzi, MC.; Zaoutis, LB. *The Philadelphia Guide: Inpatient Pediatrics*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- Fras C, Kravetz P, Mody DR, Heggeness MH. Substance P-containing nerves within the human vertebral body. an immunohistochemical study of the basivertebral nerve. *Spine J*, 2003;3(1):63-67.
- Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures, and epilepsy: a puzzle of a chicken and egg? *Epilepsia* 2011;52(suppl 8):19 –20.

Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande SV, Wang L, Buchler MW. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest*, 2003;83(5):731-742.

Fujii T, Murai M, Morimoto H, Maeda Y, Yamaoka M, Hagiwara D, Matsuo M. Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK1 receptor antagonist, FK888. *Br J Pharmacol*, 1992;107(3):785-789.

Furness, J. B., & Costa, M. (1987). *The Enteric Nervous System*. New York: Churchill Livingstone.

Furness JB, Papka RE, Della NG, Costa M, Eskay RL. Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea-pigs. *Neuroscience*, 1982;7(2):447-459.

Fuxe K, Li XM, Bjelke B, Hedlund PB, Biagini G, and Agnati LF. Possible mechanisms for the powerful actions of neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci*, 1994;739:42-59.

Gadzhieva NN. Evaluation and correction of the pain syndrome in premature newborns with CNS infringement. *Georgian Med News* 2009;169:52-6.

Gai WP, Halliday GM, Blumbergs PC, Geffen LB, Blessing WW. Substance P-containing neurons in the mesopontine tegmentum are severely affected in Parkinson's disease. *Brain*, 1991;114 ( Pt 5):2253-2267.

Gall C, Lauterborn J, Isackson P, White J. Seizures, neuropeptides regulation, and mRNA expression in the hippocampus. *Progress in Brain Research* 1990;83:371-390.

Garcia-Lopez MJ, Martinez-Martos JM, Mayas MD, Carrera MP, and Ramirez-Exposito MJ. Physiology of the neuropeptides. *Rev Neurol*, 2002;35(8):784- 793.

Garant DS, Iadarola MJ, Gale K. Substance P antagonists in substantia nigra are anticonvulsant. *Brain Res* 1986;382:372-378.

Geissbuehler V, Moser R, Zimmermann K, Hillermann R, Czarniecki J, Gebhardt SG, Eberhard J: Altered plasma neurokinin B levels in patients with pre-eclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2007;276:151-157.

Geraciotti TD, Carpenter LL, Owens MJ, Baker DG, Ekhtor NN, Horn PS, Strawn JR, Sananora G, Kinkead B, Price LH, Nemeroff CB. Elevated cerebrospinal fluid substance P concentrations in posttraumatic stress disorder and major depression. *American Journal of Psychiatry* 2006;163:637-643.

Gerfen CR, Wilson CJ, 1996. The basal ganglia. In: Swanson, L.W., Björklund, A., Hökfelt, T. (Eds.) *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Integrated Systems of the CNS. Part III*. Elsevier, Amsterdam, pp. 371-468.

Gether U, Johansen TE, Schwartz TW. Chimeric NK1 (substance P)/NK3 (neurokinin B) receptors. Identification of domains determining the binding 178 specificity of tachykinin agonists. *J Biol Chem*, 1993;268(11):7893-7898.

Ghazi-Birry HS, Brown WR, Moody DM, Challa VR, Block SM, Reboussin DM. Human germinal matrix: venous origin of hemorrhage and vascular characteristics. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 1997;18:219–229.

Gidron Y, Perry H, Glennie M. Does the vagus nerve inform the brain about preclinical tumours and modulate them?. *Lancet Oncol*, 2005;6(4):245-248.

Gillberg PG, Aquilonius SM, Eckernas SA, Lundqvist G, Winblad B. Choline acetyltransferase and substance P-like immuno-reactivity in the human spinal cord: changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*, 1982;250(2):394- 397.

Ginsburg CM, McCracken GH Jr. Urinary tract infections in young infants. *Pediatrics* 1982;69:409–12.

Gitter BD, Regoli D, Howbert JJ, Glasebrook AL, Waters DC. Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P. *J Neuroimmunol*, 1994,51(1):101-108.

Gonzalez Moles MA, Esteban F, Ruiz-Avila I, Gil Montoya JA, Brener S, Bascones-Martinez A, Muñoz M. A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation and apoptosis in oral lichen planus. *Oral Dis*, 2009;15(2):162-169.

Gonzalez Moles MA, Mosqueda-Taylor A, Esteban F, Gil-Montoya JA, Diaz-Franco MA, Delgado M, Muñoz M. Cell proliferation associated with actions of the substance P/NK-1 receptor complex in keratocystic odontogenic tumours. *Oral Oncol*, 2008;44(12):1127-1133.

Goode T, O'Connell J, Ho WZ, O'Sullivan GC, Collins JK, Douglas SD, Shanahan F. Differential expression of neurokinin-1 receptor by human mucosal and peripheral lymphoid cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000;7(3):371-376.

Grady EF, Garland AM, Gamp PD, Lovett M, Payan DG, Bunnett NW. Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven transmembrane domains NK1 receptor. *Mol Biol Cell* 1995;6:509-524.

Graham GJ, Stevens JM, Page NM, Grant AD, Brain SD, Lowry PJ, Gibbins JM. Tachykinins regulate the function of platelets. *Blood*, 2004;104(4):1058-1065.

Grammas P, Martinez J, Miller B. Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert Rev Mol Med* 2011;13:e19.

Grant AD, Akhtar R, Gerard NP, Brain SD. Neurokinin B induces oedema formation in mouse lung via tachykinin receptor-independent mechanisms. *J Physiol*, 2002;543(Pt 3):1007-1014.

Graybiel AM. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in Neuroscience* 1990;13:244–254.

Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37:24–39.

Grimmelikhuijzen CJ, Leviev I, Carstensen K. Peptides in the nervous systems of cnidarians: structure, function, and biosynthesis. *Int Rev Cytol*, 1996;167:37-89.

Guiard BP, Przybylski C, Guilloux JP, Seif I, Froger N, De Felipe C, Gardier AM. Blockade of substance P (neurokinin 1) receptors enhances extracellular serotonin when combined with a selective serotonin reuptake inhibitor: an in vivo microdialysis study in mice. *J Neurochem*, 2004;89(1):54-63.

Guo CJ, Lai JP, Luo HM, Douglas SD, HoWZ. Substance P up-regulates macrophage inflammatory protein-1 expression in human T lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology* 2002;131:160-167.

Guyton AC (1987). *Basic Neuroscience: Anatomy and Physiology*. Philadelphia: WB Saunders Co.

Guyton, AC & Hall, JE (2011). *Textbook of Medical Physiology* (12 ed.). Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.

Hagermark O, Hokfelt T, Pernow B. Flare and itch induced by substance P in human skin. *J Invest Dermatol*, 1978;71(4):233-235.

Hallberg M, Nyberg F. Neuropeptide conversion to bioactive fragments—an important pathway in neuromodulation. *Curr Protein Pept Sci*, 2003;4(1):31-44.

Haluska M, Anthony ML. Osmotic blood-brain barrier modification for the treatment of malignant brain tumors. *Clin J Oncol Nurs* 2004;8:263-267.

Harmar AJ, Hyde V, Chapman K. Identification and cDNA sequence of delta-preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor. *FEBS Lett*, 1990;275(1-2):22-24.

Harrison S, Geppetti P. Substance P. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:555-576.

Hartung HP, Toyka KV. Substance P, the immune system and inflammation. *Int Rev Immunol*, 1989;4(3):229-249.

Hashimoto M, Hayashi K, Murai M, Fujii T, Nishikawa M, Kiyoto S, Imanaka H. WS9326A, a novel tachykinin antagonist isolated from *Streptomyces violaceusniger* no. 9326. II. Biological and pharmacological properties of WS9326A and tetrahydro-WS9326A (FK224). *J Antibiot (Tokyo)*, 1992;45(7):1064-1070.

Hastrup H, Schwartz TW. Septide and neurokinin A are high-affinity ligands on the NK-1 receptor: evidence from homologous versus heterologous binding analysis. *FEBS Lett*, 1996;399(3):264-266.

Haverstick DM, Rubinstein A, Bannon MJ. Striatal tachykinin gene expression regulated by interaction of D-1 and D-2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:858-862.

Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57:173–185.

Hegde A, Zhang H, Mochhala SM and Bhatia M. “Neurokinin-1 receptor antagonist treatment protects mice against lung injury in polymicrobial sepsis.” *Journal of Leukocyte Biology* 2007;82:678-685.

Hegde A, Koh YH, Mochhala SM, Bhatia M. Neurokinin-1 receptor antagonist treatment in polymicrobial sepsis: molecular insights. *Int J Inflam* 2010;2010:601098.

Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer*, 1995;61(6):786-792.

Henry JL. Participation of substance P in spinal physiological responses to peripheral aversive stimulation. *Regul Pept*, 1993;46(1-2):138-143.

Herpfer I, Lieb K. Substance P and Substance P receptor antagonists in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *World J Biol Psychiatry*, 2003;4(2): 56- 63.

Hesketh PJ, Gralla RJ, Webb RT, Ueno W, DelPrete S, Bachinsky ME, Silberman SL. Randomized phase II study of the neurokinin 1 receptor antagonist CJ-11,974 in the control of cisplatin-induced emesis. *J Clin Oncol*, 1999;17(1):338-343.

Hill R. NK1 (substance P) receptor antagonists: why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:244–246.

Ho WZ, Douglas SD. Substance P and neurokinin-1 receptor modulation of HIV. *J Neuroimmunol*, 2004;157(1-2):48-55.

Ho WZ, Lai JP, Li Y, Douglas SD. HIV enhances substance P expression in human immune cells. *FASEB J*, 2002;16(6):616-618.

Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol*, 1997;159(11):5654-5660.

Hökfelt T, Kellerth JO, Nilsson G and Pernow B. Substance P: Localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* 1975;190:889-890.

Hokfelt T, Johansson O, Kellerth JO, Ljungdahl A, Nilsson G, Nygard A, Pernow B. Immunohistochemical distribution of substance P. En: "Substance P". Von Euler U.S. and Pernow B. (Eds.) Raven Press, New York 1977; 117-145.

Hokfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron*, 1991;7(6):867- 879.

Hokfelt T, Johansson O, Ljungdahl A, Lundberg JM, and Schultzberg M. Peptidergic neurones. *Nature*, 1980;284(5756):515-521.

Hokfelt T, Lundberg JM, Schultzberg M, Johansson O, Skirboll L, Anggard A, Goldstein M. Cellular localization of peptides in neural structures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1980;210(1178): 63-77.

Hokfelt T, Broberger C, Xu ZQ, Sergeev V, Ubink R, Diez M. Neuropeptides: an overview. *Neuropharmacology*, 2000;39(8):1337-1356.

Hokfelt T, Bartfai T, Bloom, F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol*, 2003;2(8):463-472.

Hokfelt T, Fuxe K, 1972. On the morphology and the neuroendocrine role of the hypothalamic catecholamine neurons. In: *Brain-Endocrine Interaction. Median Eminence: Structure and Function. International Symposium Munich 1971.* Karger, Basel, pp. 181-223.

Hokfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med*, 2001;249(1):27-40.

Hokfelt T, Vincent S, Dalsgaard CJ, Skirboll L, Johansson O, Schultzberg M, Jancso, G. Distribution of substance P in brain and periphery and its possible role as a co-transmitter. *Ciba Found Symp* 1982;(91):84-106.

Hokfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z, Villar M, Melander T. Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neuroscience Letters* 1987;83:217-220.

Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988; 24:739-768.

Holzer P & Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther*, 1997a;73(3):173-217.

Holzer P & Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol Ther*, 1997b;73(3):219-263.

Holst B, Zoffmann S, Elling CE, Hjorth SA, Schwartz TW. Steric hindrance mutagenesis versus alanine scan in mapping of ligand binding sites in the tachykinin NK1 receptor. *Mol Pharmacol*, 1998;53(1):166-175.

Hossain S, Akaike T, Chowdhury EH. Current approaches for drug delivery to central nervous system. *Curr Drug Deliv* 2010;7:389-397.

Hoyle, C. H. (1998). Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regul Pept*, 73(1), 1-33.

Huang PQ, Liu LX, Wei BG, Ruan YP. Asymmetric synthesis of (+)-L-733, 060 and (+)-CP-99, 994 based on a new chiral 3-piperidinol synthon. *Org Lett*, 2003;5(11):1927-1929.

Huang RR, Yu H, Strader CD, Fong TM. Interaction of substance P with the second and seventh transmembrane domains of the neurokinin-1 receptor. *Biochemistry*, 1994;33(10):3007-3013.

Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 2001;24:719–725.

Hwang L, Leichter R, Okamoto A, Payan D, Collins SM, Bunnett NW. Downregulation of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in the inflamed rat intestine. *Am J Physiol*, 1993;264(4 Pt 1):G735-743.

Ichiki T, Kuroishi KN, Gunjigake KK, Kobayashi S, Goto T. Neurokinin B activates the formation and bone resorption activity of rat osteoclasts. *Neuropeptides*, 2011;45(3):239-244.

Impicciatore M, Maraini G, Bertaccini G. Action of eledoisin on human lacrimal secretion in normal and pathological conditions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1973;279(2):127-131.

Ishihara H, Kubota H, Lindberg RL, et al. Endothelial cell barrier impairment induced by glioblastomas and transforming growth factor beta2 involves matrix metalloproteinases and tight junction proteins. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:435–448.

Janelsins BM, Mathers AR, Tkacheva OA, Erdos G, Shufesky WJ, Morelli AE, Larregina AT. Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood*, 2009;113(13):3017-3026.

Jang JH, Nam TS, Paik KS, Leem JW. Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat. *Neurosci Lett* 2004;360:129–132.

Jansen I, McCulloch AJ, Uddman R, Edvinsson L. Tachykinins (Substance P, Neurokinin A, Neuropeptide K and Neurokinin B) in the cerebral circulation: Vasomotor responses in vivo and in situ. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11:567-575.

Jessell TM. Substance P release from the rat substantia nigra. *Brain Res*, 1978;151(3):469-478.

Jiang Y, Gao G, Fang G, Gustafson EL, Lavery M, Yin Y, Murgolo NJ. PepPat, a pattern-based oligopeptide homology search method and the identification of a novel tachykinin-like peptide. *Mamm Genome*, 2003;14(5):341-349.

Johnson M, Hanson GR, Gibb JW, Adair J, Filloux F. Effect of neonatal hypoxia-ischemia on nigro-striatal dopamine receptors and on striatal neuropeptide Y, dynorphin A and substance P concentrations in rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994;83(1):109-18.

Jonas P, Bischofberger J, Sandkühler J. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 1998;281:419-424.

Jones EG. The Neuron Doctrine 1891. *J Hist Neurosci* 1994;3(1):3-20.

Joshi DD, Dang A, Yadav P, Qian J, Bandari PS, Chen K, Rameshwar P. Negative feedback on the effects of stem cell factor on hematopoiesis is partly mediated through neutral endopeptidase activity on substance P: a combined functional and proteomic study. *Blood*, 2001;98(9):2697-2706.

Joshi D, Miller MM, Seidah NG, Day R. Age-related alternations in the expression of prohormone convertase messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in hypothalamic proopiomelanocortin mRNA neurons in the female C57BL/6J mouse. *Endocrinology* 1995;136:2721-2729.

Jubair S, Li J, Dehlin HM, Manteufel EJ, Goldspink PH, Levick SP, Janicki JS. Substance P induces cardioprotection in ischemia-reperfusion via activation of AKT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(4):H676-84.

Kage R, Leeman SE, Krause JE, Costello CE, Boyd ND. Identification of methionine as the site of covalent attachment of a p-benzoylphenylalanine- containing analogue of substance P on the substance P (NK-1) receptor. *J Biol Chem*, 1996;271(42):25797-25800.

Kage R, McGregor GP, Thim L, & Conlon JM. Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J Neurochem*, 1988;50(5):1412-1417.

Kalinichev M, Bradford A, Bison S, Lucas A, Sartori I, Garbati N, Andretta F, Bate S, Austin NE, Jones DN, Read KD, Alvaro G, Large CH. Potentiation of the anticonvulsant efficacy of sodium channel inhibitors by an NK1-receptor antagonist in the rat. *Epilepsia* 2010;51:1543-1551.

Kandel ER, Schwartz JH, and Jessell TM (1998). *Neurociencia y conducta*. Madrid: Prentice Hall.

Kang BN, Jeong KS, Park SJ, Kim SJ, Kim TH, Kim HJ, Ryu SY. Regulation of apoptosis by somatostatin and substance P in peritoneal macrophages. *Regul Pept*, 2001;101(1-3):43-49.

Kang, H. S., Trzaska, K. A., Corcoran, K., Chang, V. T., & Rameshwar, P. (2004). Neurokinin receptors: relevance to the emerging immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 52(5), 338-347.

Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983;114(2):533-540.

Kant V, Gopal A, Kumar D, Bag S, Kurade NP, Kumar A, Kumar D. Topically applied substance P enhanced healing of open excision wound in rats. *Eur J Pharmacol*, 2013.

Karagiannides I, Kokkotou E, Tansky M et al. Induction of colitis causes inflammatory responses in fat depots: evidence for substance P pathways in human mesenteric preadipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:5207:5212.

Karagiannis K, Stavropoulos G, Poulos C, Jordan CC, Hagan RM. Synthesis of a potent antagonist of substance P by replacing the CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub> and the alpha-carboxamide groups of the methionine at [Orn<sup>6</sup>]-SP<sup>6-11</sup> by benzyl ester groups. *Int J Pept Protein Res*, 1993;42(6):565-569.

Karhunen T, Vilim FS, Alexeeva V, Weiss KR, and Church, PJ. Targeting of peptidergic vesicles in cotransmitting terminals. *J Neurosci*, 2001;21(3), RC127.

Kast RE. Why cerebellar glioblastoma is rare and how that indicates adjunctive use of the FDA-approved anti-emetic aprepitant might retard cerebral glioblastoma growth: a new hypothesis to an old question. *Clin Transl Oncol*, 2009;11(7):408-410.

Kawaguchi Y, Hoshimaru M, Nawa H, Nakanishi S. Sequence analysis of cloned cDNA for rat substance P precursor: existence of a third substance P precursor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986;139(3):1040-1046.

Kerdelhue B, Lenoir V, Scholler R, Jones HW, Jr. Substance P plasma concentration during the LH preovulatory surge of the menstrual cycle in the human. *Neuro Endocrinol Lett*, 2006;27(3):359-364.

Kerdelhue B, Williams RF, Lenoir V, Fardin V, Kolm P, Hodgen GD, Jones HW, Jr. Variations in plasma levels of substance P and effects of a specific substance P antagonist of the NK(1) receptor on preovulatory LH and FSH surges and progesterone secretion in the cycling cynomolgus monkey. *Neuroendocrinology*, 2000;71(4):228-236.

Khare VK, Albino AP, & Reed JA. The neuropeptide/mast cell secretagogue substance P is expressed in cutaneous melanocytic lesions. *J Cutan Pathol* 1998;25(1):2-10.

Kim KT, Kim HJ, Cho DC, Bae JS, Park SW. Substance P stimulates proliferation of spinal neural stem cells in spinal cord injury via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Spine J* 2015;15(9):2055-65.

Kimura S, Okada M, Sugita Y, Kanazawa I, Munekata E. Novel neuropeptides, neurokinin and , isolated from porcine spinal cord. *Proceedings of the Japan Academy*, 1983;59:101-104.

Kitabgi P. Neurotensin modulates dopamine neurotransmission at several levels along brain dopaminergic pathway. *Neurochemistry International* 1989;14:111–119.

Klein JO, Marcy SM. Bacterial sepsis and meningitis. En: Remington JS, Klein JO eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 4th Ed. WB Saunders Co. Philadelphia 1995: 835-90.

Klein RS, Fricker LD. Heterogenous expression of carboxypeptidase E and proenkephalin mRNAs by cultured astrocytes. *Brain Research* 1992;569:300–310.

Kotani H, Hoshimaru M, Nawa H, Nakanishi S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986;83(18):7074-7078.

Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK, Yankner BA. An in vivo model for the neurodegenerative effects of B amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7247-7251.

Kowall NW, Quigley BJ Jr., Krause JE, Lu F, Kosofsky BE, Ferrante RJ. Substance P and substance P receptor histochemistry in human neurodegenerative diseases. *Regul Pept*, 1993;46(1-2):174-185.

Kowalska K, Carr DB, Lipkowski AW. Direct antimicrobial properties of substance P. *Life Sci*, 2002,71(7):747-750.

Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Rupniak NM. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science*, 1998;281(5383):1640-1645.

Krause JE, Takeda Y, Hershey AD. Structure, functions, and mechanisms of substance P receptor action. *J Invest Dermatol*, 1992;98(6 Suppl): 2S-7S.

Kreutzberg, G.W., 1982. In: Nicholls, J.G. (Ed.) *Repair and Regeneration of the Nervous System*. Springer, Berlin, pp. 57–69.

Ko, LJ, Chiang CH, Liu WJ, Chiang W. Somatostatin, substance P, prolactin and vasoactive intestinal peptide levels in serum and cerebrospinal fluid of children with seizure disorders. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi* 1991;7(8):391-397.

Koon H-W, Zhao D, Zhan Y, Simeonidis S, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves protein kinase C activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005;314:1393-1400.

Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC and Schleimer RP. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology* 2008;123:398-410.

Kurtz MM, Wang R, Clements MK, Cascieri MA, Austin CP, Cunningham BR, Liu Q. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene*, 2002;296(1-2):205-212.

Kustova, Y., Grinberg, A., Basile, A.S., 1999. Increased blood– brain barrier permeability in LP-BM5 infected mice is mediated by neuroexcitatory mechanisms. *Brain Res.* 839, 153–163.

Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating Gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 2001;15:155–63.

Lai JP, Douglas SD, Ho WZ. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol*, 1998;86(1):80-86.

Lallemend F, Lefebvre PP, Hans G, Rigo JM, Van de Water TR, Moonen G, Malgrange B. Substance P protects spiral ganglion neurons from apoptosis via PKC-Ca<sup>2+</sup>-MAPK/ERK pathways. *J Neurochem*, 2003;87(2):508-521.

Lambrecht BN. Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respir Res*, 2001;2(3):133-138.

Lang K, Drell TL, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F. Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells. *Immunol Lett*, 2003;90(2-3):165-172.

Lasaga M, Debeljuk L. Tachykinins and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis: An update. *Peptides*, 2011;32(9):1972-1978.

Laufer R, Gilon C, Chorev M, Selinger Z. [pGlu<sup>6</sup>,Pro<sup>9</sup>]SP<sub>6-11</sub>, a selective agonist for the substance P P-receptor subtype. *J Med Chem*, 1986;29(7):1284-1288.

Lavezzi AM, Matturri L, Del Corno G, Johanson CE. Vulnerability of fourth ventricle choroid plexus in sudden unexplained fetal and infant death syndromes related to smoking mothers. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(5):319-27.

Lavielle S, Brunissen A, Carruette A, Garret C, Chassaing G. Highly potent substance P antagonists substituted with beta-phenyl- or beta-benzyl-proline at position 10. *Eur J Pharmacol*, 1994;258(3):273-276.

Lavielle S, Chassaing G, Loeuillet D, Convert O, Torrens Y, Beaujouan JC, Glowinski J. Selective agonists of tachykinin binding sites. *Fundam Clin Pharmacol*, 1990;4(3):257-268.

Lazure C, Seidah NG, Pelaprat D, Chretien M. Proteases and posttranslational processing of prohormones: a review. *Can J Biochem Cell Biol*, 1983;61(7):501-515.

Leander S, Hakanson R, Rosell S, Folkers K, Sundler F, Tornqvist K. A specific substance P antagonist blocks smooth muscle contractions induced by non-cholinergic, non-adrenergic nerve stimulation. *Nature*, 1981;294(5840):467-469.

Lecat S, Bucher B, Mely Y, Galzi JL. Mutations in the extracellular amino-terminal domain of the NK2 neurokinin receptor abolish cAMP signaling but preserve intracellular calcium responses. *J Biol Chem*, 2002;277(44):42034-42048.

Lecci A, Maggi CA. Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert Opin Ther Targets*, 2003;7(3):343-362.

Lee CM, Campbell NJ, Williams BJ, Iversen LL. Multiple tachykinin binding sites in peripheral tissues and in brain. *Eur J Pharmacol*, 1986;130(3):209-217.

Lee CM, Iversen LL, Hanley MR, Sandberg BE. The possible existence of multiple receptors for substance P. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1982;318(4):281-287.

Lee AC, Lau Y, Li CH, Wong YC, Chiang AK. Intraspinal and intracranial hemorrhage after lumbar puncture. *Pediatr Blood Cancer* 2007;48:233-237.

Lei SZ, Lipkowski AW, Wilcox GL. Opioid and neurokinin activities of substance P fragments and their analogs. *Eur J Pharmacol*, 1991;193(2):209-215.

Lembeck F. Central transmission of afferent impulses. III. Incidence and significance of the substance P in the dorsal roots of the spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, 1953;219(3):197-213.

Lembeck F, & Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1979;310(2):175-183.

Lessard A, Coleman CG, and Pickel VM. Chronic intermittent hypoxia reduces neurokinin-1 (NK1) receptor density in small dendrites of non-catecholaminergic neurons in mouse nucleus tractus solitaries. *Exp Neurol*. 2010 June ; 223(2): 634–644.

Letter AA, Matsuda LA, Merchant KM, Gibb JW, Hanson GR. Characterization of dopaminergic influence on striatalnigral neurotensin systems. *Brain Research*, 1987;422:200–203.

Li H, Leeman SE, Slack BE, Hauser G, Saltsman WS, Krause JE, Boyd ND. A substance P (neurokinin-1) receptor mutant carboxyl-terminally truncated to resemble a naturally occurring receptor isoform displays enhanced responsiveness and resistance to desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997;94(17):9475-9480.

Lieb K, Ahlvers K, Dancker K, Strohmusch S, Reincke M, Feige B, Voderholzer U. Effects of the neuropeptide substance P on sleep, mood, and neuroendocrine measures in healthy young men. *Neuropsychopharmacology*, 2002;27(6):1041-1049.

Lieb K, Fiebich BL, Berger M, Bauer J, Schulze-Osthoff K. The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B185 dependent gene expression in human astrocytoma cells. *J Immunol*, 1997;159(10):4952-4958.

Lieb KL, Treffurth Y, Hamke M, Akundi RS, von Kleinsorgen M, Fiebich BL. Valproic acid inhibits substance P-induced activation of protein kinase C epsilon and expression of the substance P receptor. *J Neurochem* 2003;86:69-76.

Lindfors N, Yamamoto Y, Pantaleo T, Lagercrantz H, Brodin E, Ungerstedt U. In vivo release of substance P in the nucleus tractus solitarii increases during hypoxia. *Neurosci Lett* 1986;69:94-97.

Linnik MD, & Moskowitz MA. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides*, 1989;10(5):957-962.

Liu H, Cao Y, Basbaum AI, Mazarati AM, Sankar R, Wasterlain CG. Resistance to excitotoxin-induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999;96(21):12096- 12101.

Liu H, Mazarati AM, Katsumori H, Sankar R, Wasterlain CG. Substance P is expressed in hippocampal principal neurons during status epilepticus and plays a critical role in the maintenance of status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999;96(9):5286-5291.

Liu Z, Lyrenas S, Thornwall M, Le Greves P, Nyberg F. Elevated cerebrospinal fluid level of substance P and decrease undecapeptidase activity at term pregnancy. *Neuropeptides* 1997;31(5):415-421.

Ljungdahl A, Hokfelt T, and Nilsson G.. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience*, 1978;3(10):861-943.

Lloyds D, Hallett MB. Activation and priming of the human neutrophil oxidase response by substance P: distinct signal transduction pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1993;1175(2):207-213.

Longmore J, Hill RG, & Hargreaves RJ. Neurokinin-receptor antagonists: pharmacological tools and therapeutic drugs. *Can J Physiol Pharmacol*, 1997;75(6):612-621.

Lorente L, Martín MM, Almeida T, Hernández M, Ramos L, Argueso M, Caceres JJ, Solé-Violán J, Jiménez A. Serum substance P levels are associated with severity and mortality in patients with severe traumatic brain injury. *Crit Care* 2015;19:192.

- Loscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 2005; 76:22-76.
- Lotz M, Carson DA, Vaughan JH. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science*, 1987;235(4791):893-895.
- Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*, 1988;241(4870):1218-1221.
- Lucas K, Karamichos D, Mathew R, Zieske JD, Stein-Streilein J. Retinal laser burn-induced neuropathy leads to a substance P-dependent loss of ocular immune privilege. *J Immunol* 2012;189(3):1237-42.
- Lundberg JM. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev*, 1996;48(1):113-178.
- Lundberg JM, Brodin E, Hua X, Saria A. Vascular permeability changes and smooth muscle contraction in relation to capsaicin-sensitive substance P afferents in the guinea-pig. *Acta Physiol Scand* 1984;120:217-227.
- Lundberg JM, Martinsson A, Hemsén A, Theodorsson-Norheim E, Svedenhag J, Ekblom B, and Hjendahl P. Co-release of neuropeptide Y and catecholamines during physical exercise in man. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985;133(1):30-36.
- Luo W, Sharif TR, Sharif M. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res*, 1996;56(21):4983-4991.
- Maggi CA. Principles of tachykinergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regul Pept*, 2000;93(1-3):53-64.
- Maggi CA, Giachetti A, Dey RD, Said SI. Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins. *Physiol Rev*, 1995;75(2), 277-322.
- Maggi CA, Giuliani S, Santicoli P, Regoli D, Meli A. Peripheral effects of neurokinins: functional evidence for the existence of multiple receptors. *J Auton Pharmacol*, 1987;7(1):11-32.
- Maggi CA, & Meli A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol*, 1988;19(1):1-43.
- Maggi CA, & Schwartz TW. The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 1997;18(10):351-355.
- Maggio JE. "Kassinin" in mammals: the newest tachykinins. *Peptides* 1985;6:237-243.

- Maghni K, Michoud MC, Alles M, Rubin A, Govindaraju V, Meloche C, Martin JG. Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-a gene: regulation by passive sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(1):103-110.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. Energy on demand. *Science* 1999;283:496-497.
- Maintz L, Wardelmann E, Walgenbach K, Fimmers R, Bieber T, Raap U, Novak N. Neuropeptide blood levels correlate with mast cell load in patients with mastocytosis. *Allergy*, 2011;66(7):862-869.
- Manak MM, Moshkoff DA, Nguyen LT, Meshki J, Tebas P, Tuluc F, Douglas SD. Anti-HIV-1 activity of the neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant and synergistic interactions with other antiretrovirals. *AIDS*, 2010;24(18):2789-2796.
- Mandel I, Paperna T, Glass-Marmor L, et al. Tight junction proteins expression and modulation in immune cells and multiple sclerosis. *J Cell Mol Med Epub* 2011 Jul 8.
- Maneuf YP, Mitchell IJ, Crossman AR, and Brotchie JM. On the role of enkephalin cotransmission in the GABAergic striatal efferents to the globus pallidus. *Exp Neurol*, 1994;125(1):65-71.
- Mantyh PW. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J Clin Psychiatry*, 2002;63 Suppl 11:6-10.
- Mantyh PW, Hunt SP, Maggio JE. Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand. *Brain Res*, 1984;307(1-2):147-165.
- Mantyh PW, Johnson DJ, Boehmer CG, Cotton MD, Vinters HV, Maggio JE, Too H, Vigna S. Substance P Receptor binding sites are expressed by glia in vivo after neuronal injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5193-5197.
- Mantyh PW, Rogers SD, Ghilardi JR, Maggio JE, Mantyh CR, Vigna S. R. Differential expression of two isoforms of the neurokinin-1 (substance P) receptor in vivo. *Brain Res*, 1996;719(1-2):8-13.
- Marchi N, Angelov L, Massaryk T, et al. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 2007;47:732-742.
- Marriott I, Mason MJ, Elhofy A, Bost KL. Substance P activates NFkappaB independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. *J Neuroimmunol* 2000;102:163-171.
- Marshall KW, Chiu B, Inman RD. Substance P and arthritis: Analysis of plasma and synovial fluid levels. *Arthritis Rheum* 1990;33(1):87-90.

Martín-Ancel A, García-Alix A, Salas S, del Castillo F, Cabañas F, Quero J. Cerebrospinal fluid leucocyte counts in healthy neonates. *Arch Dis Fetal Neonatal Ed* 2006;91:F357-F358.

Marzioni D, Fiore G, Giordano A, Nabissi M, Florio P, Verdenelli F, Castellucci M. Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90(4):2378-2383.

Massot O, Rousselle JC, Fillion MP, Grimaldi B, Cloez-Tayarani I, Fugelli A, Fillion G. 5-hydroxytryptamine-moduline, a new endogenous cerebral peptide, controls the serotonergic activity via its specific interaction with 5- hydroxytryptamine1B/1D receptors. *Mol Pharmacol*, 1996;50(4):752-762.

Masu Y, Nakayama K, Tamaki H, Harada Y, Kuno M, Nakanishi S. cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature*, 1987;329(6142):836-838.

Mathers AR, Tkacheva OA, Janelsins BM, Shufesky WJ, Morelli AE, Larregina AT. In vivo signaling through the neurokinin 1 receptor favors transgene expression by Langerhans cells and promotes the generation of Th1- and Tc1-biased immune responses. *J Immunol*, 2007;178(11):7006-7017.

Matsuishi T, Nagamitsu S, Shoji H, Itoh M, Takashima S, Iwaki T, Kato H. Increased cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Short communication. *J Neural Transm*, 1999;106(9-10):943-948.

Matsuishi T, Sakai T, Nagamitsu S, Shoji H, Ueda N, Kaneko S, Kato H. Decreased cerebrospinal fluid levels of substance P in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci*, 1996;142(1-2):107-110.

Mauborgne A, Javoy-Agid F, Legrand JC, Agid Y, Cesselin F. Decrease of substance P-like immunoreactivity in the substantia nigra and pallidum of parkinsonian brains. *Brain Res*, 1983;268(1):167-170.

McGillis JP, Mitsuhashi M, Payan DG. Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci*, 1990;594:85-94.

McKenzie JC. Atrial natriuretic peptide-like immunoreactivity in astrocytes of parenchyma and glia limitans of the canine brain. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1992;40:1211-1222.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 1998;393(6683):333-339.

McLean S, Ganong A, Seymour PA, Bryce DK, Crawford RT, Morrone J, Heym J. Characterization of CP-122,721; a nonpeptide antagonist of the neurokinin NK1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996;277(2):900-908.

- MacLeod AM, Merchant KJ, Brookfield F, Kelleher F, Stevenson G, Owens AP, Swain CJ, Cascieri MA, Sadowski S, Ber E, Strader CD, Fong TM. Identification of L-tryptophan derivatives with potent and selective antagonist activity at the NK1 receptor. *J Med Chem* 1994;37:1269-1274.
- McMillan, JA.; Feigin, RD.; DeAngelis, C.; Jones, MD. *Oski's pediatrics: principles & practice*. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- Meini S, Patacchini R, Maggi CA. Tachykinin NK1 receptor subtypes in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol*, 1994;111(3):739-746.
- Meister B, Hokfelt T. Peptide- and transmitter-containing neurons in the mediobasal hypothalamus and their relation to GABAergic systems: possible roles in control of prolactin and growth hormone secretion. *Synapse* 1988;2:585–605.
- Melner M, Low KG, Allen RG, Nielsen CP, Young SL, Saneto RP. The regulation of proenkephalin expression in a distinct population of glial cells. *EMBO Journal* 1990;9:791–796.
- Menkes, JH.; Sarnat, HB. *Child Neurology*. 6. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
- Mescher, A. L. (2010). *Junqueira's Basic Histology* (12 ed.). United States of America: The McGraw-Hill Companies.
- Metwali A, Blum AM, Ferraris L, Klein JS, Fiocchi C, Weinstock JV. Eosinophils within the healthy or inflamed human intestine produce substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Neuroimmunol*, 1994;52(1):69-78.
- Michaels LA, Kwaku OF, Zhao H and Douglas SD. Serum Levels of Substance P Are Elevated in Patients With Sickle Cell Disease and Increase Further During Vaso-Occlusive Crisis. *Blood* 1998;92:3148-3151.
- Migaud M, Roques BP, Durieux C. Evidence for a high affinity uptake for cholecystinin octapeptide (CCK8) in rat cortical synaptosomes. *European Journal of Neuroscience* 1995;7:1074–1079.
- Monaco-Shawver L, Schwartz L, Tuluc F, Guo CJ, Lai JP, Gunnam SM, Orange JS. Substance P inhibits natural killer cell cytotoxicity through the neurokinin-1 receptor. *J Leukoc Biol*, 2011;89(1):113-125.
- Morteau O, Lu B, Gerard C, Gerard NP. Hemokinin 1 is a full agonist at the substance P receptor. *Nat Immunol*, 001;2(12):1088.
- Moussaoui SM, Le Prado N, Bonici B, Faucher DC, Cuine F, Laduron PM, Garret C. Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: comparison with neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaicin treatment. *Neuroscience*, 1992;48(4):969-978.

Mravec B, Gidron Y, Kukanova B, Bizik J, Kiss A, Hulin I. Neuralendocrine-immune complex in the central modulation of tumorigenesis: facts, assumptions, and hypotheses. *J Neuroimmunol*, 2006;180(1-2):104-116.

Muñoz M, Andrés Carranza, Antonio Pavón, George Anderson y Rafael Coveñas. Immunolocalization of Substance P and NK-1 Receptor in Hofbauer Cells in Human Normal Placenta. *Microscopy Research and Technique* 2013a;76:1310-1313.

Muñoz M & Coveñas R. Neurokinin-1 receptor: a new promising target in the treatment of cancer. *Discov Med*, 2010;10(53):305-313.

Muñoz M, Coveñas R. NK-1 receptor antagonists: a new paradigm in pharmacological therapy. *Curr Med Chem*, 2011;18(12):1820-1831.

Muñoz M, Coveñas R. NK-1 receptor antagonists: a new generation of anticancer drugs. *Mini Rev Med Chem*, 2012;12(7):593-599.

Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human Pathology. *Amino Acids* 2014;46(7):1727-50.

Muñoz M, Gonzalez-Ortega A, Coveñas R. The NK-1 receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant and other NK-1 receptor antagonists on acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Invest New Drugs*, 2012;30(2):529-540.

Muñoz M, Gonzalez-Ortega A, Rosso M, Robles-Frias MJ, Carranza A, Salinas- Martin MV, Coveñas R. The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: Focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists. *Peptides*, 2012.

Muñoz M, Martinez-Armesto J, Coveñas R. NK-1 receptor antagonists as antitumor drugs: a survey of the literature from 2000 to 2011. *Expert Opin Ther Pat*, 2012; 22(7):735-746.

Muñoz M, Pavon A, Rosso M, Salinas MV, Perez A, Carranza A, Gonzalez- Ortega A. Immunolocalization of NK-1 receptor and Substance P in human normal placenta. *Placenta*, 2010;31(7):649-651.

Muñoz M, Perez A, Coveñas R, Rosso M, Castro E. Antitumoural action of L-733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines. *Arch Ital Biol*, 2004;142(2):105-112.

Muñoz M, Perez A, Rosso M, Zamarrigo C, Rosso R. Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733 060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Res*, 2004;14(3):183-188.

Muñoz M, Rosso M. The NK-1 receptor antagonist aprepitant as a broad spectrum antitumor drug. *Invest New Drugs*, 2010;28(2):187-193.

Muñoz M, Rosso M, Aguilar FJ, Gonzalez-Moles MA, Redondo M, Esteban F. NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line HEP-2. *Invest New Drugs*, 2008;26(2):111-118.

Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. In: *Focus on Neuroblastoma Research*, Fernandes, Ed.; Nova Science Publishers: New York 2007;31-56.

Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. *Curr Med Chem*, 2010;17(6):504-516.

Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy. *Curr Drug Targets*, 2011;12(6):909-921.

Muñoz M, Rosso M, Coveñas R, Montero I, Gonzalez-Moles MA, Robles MJ. Neurokinin-1 receptors located in human retinoblastoma cell lines: antitumor action of its antagonist, L-732,138. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007;48(6):2775-2781.

Muñoz M, Rosso M, Gonzalez A, Saenz J, Coveñas R. The broadspectrum antitumor action of cyclosporin A is due to its tachykinin receptor antagonist pharmacological profile. *Peptides*, 2010;31(9):1643-1648.

Muñoz M, Rosso M, Perez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarrigo C, Piruat JJ. The NK1 receptor is involved in the antitumoral action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines. *Neuropeptides*, 2005;39(4):427-432.

Muñoz M, Rosso M, Perez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarrigo C, Montero, I. Antitumoral action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005;46(7):2567-2570.

Muñoz M, Rosso M, Robles-Frias MJ, Salinas-Martin MV, Rosso R, Gonzalez-Ortega A, Coveñas R. The NK-1 receptor is expressed in human melanoma and is involved in the antitumor action of the NK-1 receptor antagonist aprepitant on melanoma cell lines. *Lab Invest*, 2010;90(8):1259-1269.

Mussap CJ, Geraghty DP, Burcher E. Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. *J Neurochem*, 1993;60(6):1987-2009.

Nag S, Kapadia A, Stewart DJ. Review: molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37:3-23.

Nagamitsu S, Matsuishi T, Onishi A, Kato H. Decreased cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with congenital sensory neuropathy with anhidrosis. *Neurology* 48:1133.

Nagamitsu S, Matsuishi T, Komori H, Yamashita Y, Eguchi H, Ichikawa K, Fujimoto T, Kato H. Age-related changes in the cerebrospinal fluid level of  $\beta$ -endorphin and substance P. Short Communication. *Journal of Neural Transmission* 1998;105:53-58.

- Naidoo BT. The cerebrospinal fluid in the healthy newborn infant. *S Afr Med J* 1968;42:933–5.
- Nakagawa N, Sano H, Iwamoto I. Substance P induces the expression of intercellular adhesion molecule-1 on vascular endothelial cells and enhances neutrophil transendothelial migration. *Peptides*, 1995;16(4):721-725.
- Nakanishi S. Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci*, 1991;14:123- 136.
- Narumi S, Maki Y. Stimulatory effects of substance P on neurite extension and cyclic AMP levels in cultured neuroblastoma cells. *J Neurochem* 1977;30:1321-1326.
- Nascimento-Carvalho CM, Moreno-Carvalho OA. Normal cerebrospinal fluid values in full-term gestation and premature neonates. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56:375-80.
- Navari RM. Fosaprepitant (MK-0517): a neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Expert Opin Investig Drugs*, 2007;16(12):1977-1985.
- Nawa H, Doteuchi M, Igano K, Inouye K, & Nakanishi S. Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sci*, 1984;34(12):1153-1160.
- Nawa H, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Nakanishi S. Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature*, 1983;306(5938):32-36.
- Nawa H, Kotani H, Nakanishi S. Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature*, 1984;312(5996):729-734.
- Nemeroff CB. The interaction of neurotensin with dopaminergic pathways in the central nervous system: basic neurobiology and implications for the pathogenesis and treatment of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 1986;11:15–37.
- Nicoll RA. Substance P is a transmitter candidate. *Annu Rev Neurosci* 1980;3:227-268.
- Nielsch V, Bisby MA, Keen P. Effect of cutting or crushing the rat sciatic nerve on synthesis of substance P by isolated L5 dorsal root ganglia. *Neuropeptides* 1987;10:137–145.
- Nilsson G, Dahlberg K, Brodin, E, Sundler F, & Strandberg K (1977). Distribution and constrictor effect of substance P in guinea pig tracheobronchial tissues. In U. S. Von Euler & B. Pernow (Eds.), *Substance P* (pp. 75-81). New York: Raven.
- Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature*, 1985;315(6014):61-63.

Nimmo AJ, Cernak I, Heath DL, Hu X, Bennett CJ, Vink R. Neurogenic inflammation is associated with development of edema and functional deficits following traumatic brain injury in rats. *Neuropeptides*, 2004;38(1):40-47.

Nio DA, Moylan RN, Roche JK. Modulation of T lymphocyte function by neuropeptides. Evidence for their role as local immunoregulatory elements. *J Immunol* 1993;150:5281-5288.

Noguchi K, Senba E, Morita Y, Sato M, Tohyama M.  $\alpha$ -CGRP and  $\beta$ -CGRP mRNAs are differentially regulated in the rat spinal cord and dorsal root ganglion. *Molecular Brain Research* 1990;7:299-304.

Nutt JG, Mrox EA, Leeman SE, Williams AC, Engel WK, Chase TN. Substance P in human cerebrospinal fluid: reductions in peripheral neuropathy and autonomic dysfunction. *Neurology* 1980;30(12):1280-5.

O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*, 2004;201(2):167-180.

O'Connor WT, Tanganelli S, Ungerstedt U, and Fuxe K. The effects of neurotensin on GABA and acetylcholine release in the dorsal striatum of the rat: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*, 1992;573(2):209-216.

Offermanns, S., & Rosenthal, W. (2008). *Encyclopedia of Molecular Pharmacology* (2nd ed.): Springer.

Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular characterization of the three tachykinin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 1991;632:53-62.

Okada T, & Palczewski K. Crystal structure of rhodopsin: implications for vision and beyond. *Curr Opin Struct Biol*, 2001;11(4):420-426.

Okamoto A, Lovett M, Payan DG, Bunnett NW. Interactions between neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and the substance P (NK1) receptor expressed in mammalian cells. *Biochem J*, 1994;299 ( Pt 3).683-693.

Olson LC, Portnoy JM. Normal cerebrospinal fluid values [Letter]. *Pediatrics* 1985;76:1024.

Ortega HH, Salvetti NR, Baravalle C, Lorente JA, Mira GA. Oestradiol induced inhibition of neuroendocrine marker expression in Leydig cells of adult rats. *Reprod Domest Anim*, 2006;41(3):204-209.

Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Somogyi P. Colocalization of glycine-like and GABA-like immunoreactivities in Golgi cell terminals in the rat cerebellum: a postembedding light and electron microscopic study. *Brain Research* 1988;450:342-353.

Otila E: Studies on the cerebrospinal fluid in premature infants. *Acta Paediatr* 1948;35(Suppl):8.

Owens T, Bechman I, Engelhardt B. Neurovascular Spaces and the Two Steps to Neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67:1113-21.

Oyamada H, Takatsuji K, Senba E, Mantyh PW, Tohyama M. Postnatal development of NK1, NK2, and NK3 neurokinin receptor sexpression in the rat retina. *Brain Res Dev Brain Res* 1999;117(1):59-70.

Page NM. Neurokinin B and pre-eclampsia: a decade of discovery. *Biology and Endocrinology* 2010;8:4.

Page NM, Bell NJ., Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG, & Lowry PJ. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003;100(10):6245-6250.

Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci*, 2004;61(13):1652-1663.

Page NM. New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides*, 2005;26(8):1356-1368.

Page NM, Woods RJ, Lowry PJ. A regulatory role for neurokinin B in placental physiology and pre-eclampsia. *Regul Pept*, 2001;98(3):97-104.

Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, Lowry PJ. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature*, 2000;405(6788):797-800.

Painter RG, Dukes R, Sullivan J, Carter R, Erdos EG, Johnson AR. Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *J Biol Chem*, 1988;263(19):9456-9461.

Palanche T, Ilien B, Zoffmann S, Reck MP, Bucher B, Edelstein SJ, Galzi JL. The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. *J Biol Chem*, 2001;276(37):34853-34861.

Palma C, Bigioni M, Irrissuto C, Nardelli F, Maggi C A, Manzini S. Anti-tumour activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cancer*, 2000;82(2):480-487.

Pan W, Kastin AJ, Gera L, Stewart JM. Bradykinin antagonist decreases early disruption of the blood– spinal cord barrier after spinal cord injury in mice. *Neurosci. Lett.* 2001;307:25– 28.

Pantaleo N, Chadwick W, Park SS, Wang L, Zhou Y, Martin B, Maudsley S. The mammalian tachykinin ligand-receptor system: an emerging target for central neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010;9(5):627-635.

Parenti C, Arico G, Ronsisvalle G, Scoto GM. Supraspinal injection of Substance P attenuates allodynia and hyperalgesia in a rat model of inflammatory pain. *Peptides*, 2012;34(2):412-418.

Park SW, Yan YP, Satriotomo I, Vemuganti R, Dempsey RJ. Substance P is a promoter of adult neural progenitor cell proliferation under normal and ischemic conditions. *J Neurosurg*, 2007;107(3):593-599.

Parris WC, Kambam JR, Naukam RJ, Rama Sastry BV. Immunoreactive substance P is decreased in saliva of patients with chronic back pain syndromes. *Anesthes Analg* 1990;70(1):63-67.

Pascual DW, Bost KL. Substance P production by P388D1 macrophages: a possible autocrine function for this neuropeptide. *Immunology*, 1990;71(1):52-56.

Pascual DW, Xu-Amano JC, Kiyono H, McGhee JR, Bost KL. Substance P acts directly upon cloned B lymphoma cells to enhance IgA and IgM production. *J Immunol* 1991;146:2130-2136.

Patacchini R, Lecci A, Holzer P, Maggi CA. Newly discovered tachykinins raise new questions about their peripheral roles and the tachykinin nomenclature. *Trends Pharmacol Sci*, 2004;25(1):1-3.

Patacchini R, Maggi CA. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *Eur J Pharmacol*, 2001;429(1-3):13-21.

Payan DG. Neuropeptides and inflammation: The role of substance P. *Annu Rev Med* 1989;40:341-352.

Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol*, 1983,131(4):1613-1615.

Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto, FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci*, 2004;74(12):1445-1463.

Pennefather JN, Zeng XP, Gould D, Hall S, Burcher E. Mammalian tachykinins stimulate rat uterus by activating NK-2 receptors. *Peptides*, 1993;14(2):169-174.

Penny GR, Afsharpour S, Kitai ST. The glutamate decarboxylase-, leucine enkephalin-, methionine enkephalin- and substance P-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat and cat: evidence for partial population overlap. *Neuroscience* 1986;17:1011-1045.

Per H, Kumandas S, Gumus H, Yikilmaz A, Kurtsoy A Iatrogenic epidermoid tumor: late complication of lumbar puncture. *J Child Neurol* 2007;22:332-336.

Perkin, RM.; Swift, JD.; Newton, DA.; Anas, NG. *Pediatric Hospital Medicine: Textbook of Inpatient Management*. Philadelphia; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev*, 1983;35(2):85-141.

- Pernow B. Role of tachykinins in neurogenic inflammation. *J Immunol*, 1985;135(2 Suppl):812s-815s.
- Pfister HW, Kümpfel T, Koedel U. Involvement of substance P in pial arteriolar vasodilatation during pneumococcal meningitis in the rat. *NeuroReport* 1995;6:1301–1305.
- Petitot F, Saffroy M, Torrens Y, Lavielle S, Chassaing G, Loeuillet D, Beaujouan JC. Possible existence of a new tachykinin receptor subtype in the guinea pig ileum. *Peptides*, 1992;13(2):383-388.
- Piedimonte G, Bertrand C, Geppetti P, Snider RM, Desai MC, Nadel JA. A new NK1 receptor antagonist (CP-99,994) prevents the increase in tracheal vascular permeability produced by hypertonic saline. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993;266(1):270-273.
- Pieri M, Amadoro G, Carunchio I, Ciotti MT, Quaresima S, Florenzano F, Severini C. SP protects cerebellar granule cells against beta-amyloid-induced apoptosis by down-regulation and reduced activity of Kv4 potassium channels. *Neuropharmacology*, 58(1), 268-276.
- Pintado CO, Pinto FM, Pennefather JN, Hidalgo A, Baamonde A, Sanchez T, Candenas ML. A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biol Reprod*, 2003;69(3):940-946.
- Pinto FM, Almeida TA., Hernandez M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol*, 2004;494(2-3):233-239.
- Pinto FM, Cintado CG, Devillier P, Candenas ML. Expression of preprotachykinin-B, the gene that encodes neurokinin B, in the rat uterus. *Eur J Pharmacol*, 2001;425(2):R1-2.
- Porcelli M, Casu M, Lai A, Saba G, Pinori M, Cappelletti S, Mascagni P. Cyclic pentapeptides of chiral sequence DLDDL as scaffold for antagonism of G-protein coupled receptors: synthesis, activity and conformational analysis by NMR and molecular dynamics of ITF 1565 a substance P inhibitor. *Biopolymers*, 1999;50(2):211-219.
- Portnoy JM, Olson LC. Normal cerebrospinal fluid values in children: another look. *Pediatrics* 1985;75:484–7.
- Powell D, Leeman S, Tregear GW, Niall HD, Potts JT, Jr. Radioimmunoassay for substance P. *Nat New Biol*, 1973;241(112):252-254.
- Qian J, Ramroop K, McLeod A, Bandari P, Livingston DH, Harrison JS, Rameshwar P. Induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and activation of caspase-3 in hypoxia-reoxygenated bone marrow stroma is negatively regulated by the delayed production of substance P. *J Immunol* 2001;167(8):4600-8.

Quigley BJ, Kowall NW. Substance P-like immunoreactive neurons are depleted in Alzheimers disease cerebral cortex. *Neuroscience* 1991;41(1):41-60.

Quincke HI. *Verhandlungen des Congresses für Innere Medizin, Wiesbaden*. 1891;10:321–331. Quincke HI. *Die Technik der Lumbalpunktion*. 1902. Berlin & Vienna.

Quinlan KL, Song IS, Bunnett N W, Letran E, Steinhoff M, Harten B, Ansel, J. C. Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. *Am J Physiol*, 1998;275(6 Pt 1):C1580-1590.

Radhakrishnan V, and Henry JL. Electrophysiology of neuropeptides in the sensory spinal cord. *Prog Brain Res*, 1995;104:175-195.

Radhakrishnan V, Henry JL. Novel substance P antagonist, CP-99,345, blocks responses of cat spinal dorsal horn neurones to noxious cutaneous stimulation and to substance P. *Neurosci Lett* 1991;132:39-43.

Rameshwar P, Gascon P, Ganea D. Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J Immunol*, 1993;151(5):2484-2496.

Rameshwar P, & Gascon P. Substance P (SP) mediates production of stem cell factor and interleukin-1 in bone marrow stroma: potential autoregulatory role for these cytokines in SP receptor expression and induction. *Blood*, 1995;86(2):482-490.

Rameshwar P, & Gascon P. Hematopoietic modulation by the tachykinins. *Acta Haematol*, 1997;98(2):59-64.

Rameshwar P, Oh HS, Yook C, Gascon P, Chang VT. Substance p-fibronectin-cytokine interactions in myeloproliferative disorders with bone marrow fibrosis. *Acta Haematol*, 2003;109(1):1-10.

Ramón y Cajal, S. (1892). El nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos. *Revista de Ciencias Médicas*, 18, 457-476.

Ranson SW, Clark SL: *Anatomy of the Nervous System*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1959.

Rapoport SI. *Blood-brain barrier in physiology and medicine*. New York: Raven press, 1976:79-85.

Ravina CG, Seda M, Pinto FM, Orea A, Fernandez-Sanchez M, Pintado CO, Candenás ML. A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. *Hum Reprod*, 2007;22(6):1617-1625.

Reed-Hagen AE, Tsuchiya M, Shimada K, Wentland JA, Obach RS. Pharmacokinetics of ezlopitant, a novel non-peptidic neurokinin-1 receptor antagonist in preclinical species and metabolite kinetics of the pharmacologically active metabolites. *Biopharm Drug Dispos*, 1999;20(9):429-439.

- Richfield EK, Vonsattel JP, MacDonald ME, Sun Z, Deng YP, Reiner A. Selective loss of striatal preprotachykinin neurons in a phenocopy of Huntington's disease. *Mov Disord*, 2002;17(2):327-332.
- Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev*, 1994;46(4):551-599.
- Regoli D, Drapeau G, Dion S, D'Orleans-Juste P. Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life Sci*, 1987;40(2):109-117.
- Regoli D, Drapeau G, Dion S, D'Orleans-Juste P. Receptors for substance P and related neurokinins. *Pharmacology*, 1989;38(1):1-15.
- Reinke E, Fabry Z. Breaking or making immunological privilege in the central nervous system: the regulation of immunity by neuropeptides. *Immunol Lett*, 2006;104(1-2):102-109.
- Reinke EK, Johnson MJ, Ling C, Karman J, Lee J, Weinstock JV, Fabry, Z. Substance P receptor mediated maintenance of chronic inflammation in EAE. *J Neuroimmunol*, 2006;180(1-2):117-125.
- Remington, JS.; Klein, JO. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 6. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
- Reynolds F. Neurological infections after neuraxial anesthesia. *Anesthesiol Clin*, 2008;26:23-52.
- Richman JM, Joe EM, Cohen SR, Rowlingson AJ, Michaels RK, Jeffries MA, et al. Bevel direction and postdural puncture headache: a meta-analysis. *Neurologist*. 2006;12:224-8.
- Rimon R, Le Greves P, Nyberg F, Heikkila L, Salmela L, Terenius L. Elevation of substance P-like peptides in the CSF of psychiatric patients. *Biol Psychiatry*, 1984;19(4):509-516.
- Rissler K. Sample preparation, high-performance liquid chromatographic separation and determination of substance P-related peptides. *J Chromatogr* 1995; B 665:233–270.
- Roberts MH. The spinal fluid in the new-born. *JAMA* 1925;85:500–3.
- Roberts TK, Buckner CM, Berman JW. Leukocyte transmigration across the blood-brain barrier: perspectives on neuroAIDS. *Front Biosci* 2010;15:478 –536.
- Robertson, J.; Shilkofski, N., editors. *Johns Hopkins: The Harriet Lane Handbook: A Manual for Pediatric House Officers*. 17. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005.

Robinson P, Garza A, Moore J, Eckols TK, Parti S, Balaji V, Vallejo J, Tweardy DJ. Substance P is required for the pathogenesis of EMCV infection in mice. *Int J Clin Exp Med* 2009;2:76–86.

Rodriguez PL, Jiang S, Fu Y, Avraham S, Avraham HK. The proinflammatory peptide substance P promotes blood-brain barrier breaching by breast cancer cells through changes in microvascular endothelial cell tight junctions. *Int J Cancer* 2014;134(5):10034-44.

Rodriguez AF, Kaplan SL, Mason EO, Jr. Cerebrospinal fluid values in the very low birth weight infant. *J Pediatr* 1990;116:971-4.

Rodríguez-Segade S. Líquido cefalorraquídeo. *Ed Cont Lab Clin* 2006;9:49-56.  
Roger M, Clavreul A, Vernier-Julienne MC, et al. The potential of combinations of drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells for glioma therapy. *Biomaterials* 2011;32:2106-2116.

Roques BP, Noble F. Dual inhibitors of enkephalin-degrading enzymes (neutral endopeptidase 24.11 and aminopeptidase N) as potential new medications in the management of pain and opioid addiction. *NIDA Research Monographs* 1995;147:104–145.

Rosler N, Wichart I, Jellinger KA. Clinical significance of neurobiochemical profiles in the lumbar cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *J Neural Transm*, 2001;108(2):231-246.

Rosso M, Muñoz M, Berger M. The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *ScientificWorldJournal*, 2012, 381434. doi: 10.1100/2012/381434

Rosso M, Robles-Frias MJ, Covenas R, Salinas-Martin MV, Muñoz M. The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biol*, 2008;29(4):245-254.

Rupniak NM, Carlson EC, Boyce S, Webb JK, Hill RG. Enantioselective inhibition of the formalin paw late phase by the NK-1 receptor antagonist L-733,060 in gerbils. *Pain* 1996;67:189–195.

Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, Wheeldon A. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology*, 2000;39(8):1413-1421.

Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, MacKillip, F. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum*, 1994;37(11):1593-1601.

Saffroy M, Torrens Y, Glowinski J, Beaujouan JC. Presence of NK2 binding sites in the rat brain. *J Neurochem*, 2001;79(5):985-996.

Sagan, S., Beaujouan, J. C., Torrens, Y., Saffroy, M., Chassaing, G., Glowinski, J., Lavielle S. High affinity binding of [3H]propionyl-[Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P(7-11), a tritiated septide-like peptide, in Chinese hamster ovary cells expressing human neurokinin-1 receptors and in rat submandibular glands. *Mol Pharmacol*, 52(1), 120-127.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987;4(4):406-425.

Sakurada S, Orito, T, Sakurada C, Sato T, Hayashi T, Mobarakeh JI, Sakurada T. Possible involvement of tachykinin NK(1) and NMDA receptors in histamine-induced hyperalgesia in mice. *Eur J Pharmacol*, 2002;434(1-2):29- 34.

Sakurada T, Manome Y, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K, Ohba M, Terenius L. A selective and extremely potent antagonist of the neurokinin-1 receptor. *Brain Res*, 1992;593(2):319-322.

Sakurada T, Yogo H, Manome Y, Tan-No K, Sakurada S, Yamada A, Ohba M. Pharmacological characterisation of NK1 receptor antagonist, [DTrp<sup>7</sup>] sendide, on behaviour elicited by substance P in the mouse. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1994;350(4):387-392.

Sakurada T, Yuhki M, Inoue M, Sakurada C, Tan-No K, Ohba M. Sakurada S. Opioid activity of sendide, a tachykinin NK1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, 1999;369(3):261-266.

Samsam M, Covenas R, Csillik B, Ahangari R, Yajeya J, Riquelme R, Narvaez JA, Tramu G. Depletion of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide from the contralateral and ipsilateral caudal trigeminal nucleus following unilateral electrical stimulation of the trigeminal ganglion; A Involvement of substance P and the NK-1 receptor possible neurophysiological and neuroanatomical link to generalized head pain. *J Chem Neuroanat* 2001;21:161–169.

Samson K. Die liquordiagnostik im kindesaltor. *Ergeb inn Med Kinderheilkd* 1931;41:553.

Sanfilippo JS, Williams RS, Yussman MA, Cook CL, Bissonnette F. Substance P in peritoneal fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166(1 Pt 1):155-9.

Santini D, Vincenzi, B, Guida FM, Imperatori M, Schiavon G, Venditti O, Tonini G. Aprepitant for management of severe pruritus related to biological cancer treatments: a pilot study. *Lancet Oncol*, 2012;13(10):1020-1024.

Sarff LD, Platt LH, McCracken GH Jr. Cerebrospinal fluid evaluation in neonates: comparison of high-risk infants with and without meningitis. *J Pediatr* 1976;88:473–7.

Schalling M, Dagerlind A, Brene S, Petterson R, Kvist S, Brownstein M, et al. Localization of mRNA for phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) using in situ hybridization. *Acta Physiol Scand*, 1987;131(4):631-632.

Schedlowski M, Fluge T, Richter S, Tewes U, Schmidt RE, Wagner TO. Beta-endorphin, but not substance-P, is increased by acute stress in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 1995;20(1):103-110.

Schmetterer L, Polak K. Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow. *Prog Retin Eye Res*. 2001 Nov;20(6):823-47.

Schmid E, Nogalo M, Bechrakis NE, Fischer-Colbrie R, Tasan R, Sperk G, Theurl M, Beer AG, Kirchmair R, Herzog H, Troger J. Secretoneurin, substance P and neuropeptide Y in the oxygen-induced retinopathy in C57Bl/6N mice. *Peptides*. 2012;37(2):252-7.

Scholle S, Glaser S, Zwacka G, Scheidt B. Plasma levels of beta-endorphin and substance P in the first year of life in full-term and preterm infants. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:1237-9.

Schoofs L, Holman GM, Hayes TK, Nachman RJ, & De Loof A. Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *FEBS Lett*, 1990;261(2):397-401.

Schoofs L, Veelaert D, Vanden Broeck J, De Loof A. Peptides in the locust *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Peptides* 1997;18:145–156.

Schwartz, JP. Neurotransmitters as neurotrophic factors: a new set of functions. *Int Rev Neurobiol*, 1992;34:1-23.

Schwartz JP, Costa E. Hybridization approaches to the study of neuropeptides. *Annu Rev Neurosci* 1986;9:277-304.

Schwartz JP, Simantov R. Developmental expression of proenkephalin mRNA in rat striatum and in striatal cultures. *Developments in Brain Research* 1988;40:311–314.

Schwartz L, Spitsin SV, Meshki J, Tuluc F, Douglas SD, Wolfe JH. Substance P enhances HIV-1 infection in human fetal brain cell cultures expressing full-length neurokinin-1 receptor. *J Neurovirol*, 2013. doi: 10.1007/s13365-013-0166-x.

Schwarzer C, Sperk G, Samanin R, Rizzi M, Gariboldi M, Vezzani A. Neuropeptides — immunoreactivity and their mRNA expression in kindling: functional implications for limbic epileptogenesis. *Brain Research Review* 1996;22:27–50.

Schwyzer, R. Membrane-assisted molecular mechanism of neurokinin receptor subtype selection. *EMBO J*, 1987;6(8):2255-2259.

Seidah, NG, Chretien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 1999;848(1-2):45-62.

Seller M J, Adinolfi M. Levels of albumin, alpha-fetoprotein, and IgG in human fetal cerebrospinal fluid. *Arch Dis Child* 1975;50:484-5.

Seller M J, Adinolfi M. Blood-brain barrier in the human fetus. *Lancet* 1975;1:1030-1.

Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30:459–473.

Serra MC, Calzetti F, Ceska M, Cassatella MA. Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology*, 1994;82(1):63-69.

Severini C, Salvadori S, Guerrini R, Falconieri-Erspamer G, Mignogna G, Erspamer V. Parallel bioassay of 39 tachykinins on 11 smooth muscle preparations. Structure and receptor selectivity/affinity relationship. *Peptides*, 2000;21(11):1587-1595.

Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev*, 2002;54(2):285-322.

Shavit I, Keidan I, Augarten A. The practice of pediatric procedural sedation and analgesia in the emergency department. *Eur J Emerg Med* 2006;13:270-275.

Shehab SA, Atkinson ME. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases in the spinal cord after peripheral axotomy of the sciatic nerve originate from primary afferent neurons. *BrainResearch* 1986;372:37–44.

Shen XZ, Bernstein KE. The peptide network regulated by angiotensin converting enzyme (ACE) in hematopoiesis. *Cell Cycle*, 2011;10(9):1363-1369.

Shepherd, G. (1991). *Foundations of the neuron doctrine*. New York: Oxford University Press.

Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, et al. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:288 –297.

Shimizu Y, Matsuyama H, Shiina T, Takewaki T, Furness JB. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci*, 2008;65(2):295-311.

Shinoda H, Marin AM, Schwartz JP. Developmental expression of the proenkephalin and prosomatostatin genes in cultured cortical and cerebellar astrocytes. *Developments in Brain Research* 1992;67:205–210.

Shinoda H, Marini A, Cosi C, Schwartz J. Brain region and gene specificity of neuropeptide gene expression. *Science* 1989;245:415–417.

Siegel T, Rubinstein R, Bokstein F, et al. In vivo assessment of the window of barrier opening after osmotic blood-brain barrier disruption in humans. *J Neurosurg* 2000;92:599-605.

Simka M. Blood brain barrier compromise with endothelial inflammation may lead to autoimmune loss of myelin during multiple sclerosis. *Curr Neurovasc Res* 2009;6: 132–139.

Simon C, Portalier P, Chamoin MC, & Ternaux JP. Substance P likeimmunoreactivity release from enterochromaffin cells of rat caecum mucosa. Inhibition by serotonin and calcium-free medium. *Neurochem Int*, 1992;20(4):529-536.

Sivam SP, Krause JE. Tachykinin systems in the spinal cord and basal ganglia: influence of neonatal capsaicin treatment or dopaminergic intervention on levels of peptides, substance P-encoding mRNAs, and substance P receptor mRNA. *J Neurochem*, 59(6), 2278-2284.

Skinner DC, Lang AL, Pahl L, Wang Q. Substance P-immunoreactive cells in the ovine pars tuberalis. *Neuroendocrinology*, 2009;89(1):3-8.

Skowronska M, Zielinska M, Wojcik-Stanaszek L, et al. Ammonia increases paracellular permeability of rat brain endothelial cells by a mechanism encompassing oxidative/ nitrosative stress and activation of matrix metalloproteinases. *J Neurochem Epub* 2012 Jan 19.

Snider RM, Constantine JW, Lowe JA, 3rd, Longo KP, Lebel WS, Woody HA. A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor. *Science*, 1991;251(4992):435-437.

Somogyi P, Priestley JV, Cuello AC, Smith AD, Bolam JP. Synaptic connections of substance P-immunoreactive nerve terminals in the substantia nigra of the rat. A correlated light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res*, 1982;223(3):469-486.

Soni V, Jain A, Khare P, et al. Potential approaches for drug delivery to the brain: past, present and future. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2010;27:187-236.

Sonomura T, Nakamura K, Furuta T, Hioki H, Nishi A, Yamanaka A, Kaneko, T. Expression of D1 but not D2 dopamine receptors in striatal neurons producing neurokinin B in rats. *Eur J Neurosci*, 2007;26(11):3093-3103.

Souza DG, Mendonca VA, de, ACMS, Poole S, Teixeira MM. Role of tachykinin NK receptors on the local and remote injuries following ischaemia and reperfusion of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol*, 2002;135(2):303-312.

Springer J, Fisher A. Substance P-induced pulmonary vascular remodelling in precision cut lung slices. *Eur Respir J* 2003;22(4):596-601.

Spruce BA, Curtis R, Wilkin GP, Glover DMA. A neuropeptide precursor in cerebellum: proenkephalin exists in subpopulations of both neurons and astrocytes. *EMBO Journal* 1990;9:1787–1795.

Srinivasan M, Goiny M, Pantaleo T, Lagercrantz H, Brodin E, Runold M, Yamamoto Y. Enhanced in vivo release of substance P in the nucleus tractus solitarius during hypoxia in the rabbit: role of peripheral input. *Brain Res* 1991;546:211–216.

St'astny, F., Skultetyova, I., Pliss, L., Jezova, D., 2000. Quinolinic acid enhances permeability of rat brain microvessels to plasma albumin. *Brain Res. Bull.* 53, 415–420.

Steine-Martin A, Osborne JG, Hauser KF. Co-localization of proenkephalin mRNA using cRNA probes and a cell-type-specific immunocytochemical marker for intact astrocytes in vitro. *Journal of Neuroscience Methods* 1991;36:119–126.

Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol*, 2004;5(6):575-581.

Stenkamp RE, Teller DC, Palczewski K. Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor. *ChemBiochem*, 2002;3(10):963-967.

Stewart D. The normal cerebro-spinal fluid in children. *Archives of Disease in Childhood* 1928:96–108.

Stewart-Lee A, Burnstock G. Actions of tachykinins on the rabbit mesenteric artery: substance P and [Glp6,L-Pro9]SP6-11 are potent agonists for endothelial neurokinin-1 receptors. *Br J Pharmacol*, 1989;97(4):1218-1224.

Storch De Gracia P, De La Torre M, Martín MJ, García S, Domínguez G, R. Novoa R. Do paediatricians perform lumbar puncture correctly? Review of recommendations and analysis the technique in Spain. *An Pediatr*.2012;77:115-23.

Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, and Dixon RA. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*, 1994;63:101- 132.

Strand FL, Rose KJ, Zuccarelli LA, Kume J, Alves SE, Antonawich FJ, and Garrett LY. Neuropeptide hormones as neurotrophic factors. *Physiol Rev*, 1991;71(4):1017-1046.

Strand, FL (1999). Distribution and localization of neuropeptides. In F. L. Strand (Ed.), *Neuropeptides: regulators of physiological processes* (pp. 65-76). London Bradford.

Straus SE, Thorpe KE, Holroyd-Leduc J. How do I perform a lumbar puncture and analyze the results to diagnose bacterial meningitis. *JAMA*, 296 (2006), pp. 2012-2022.

Strazza M, Pirrone V, Wigdahl B, Nonnemacher MR. Breaking down the barrier: the effects of HIV-1 on the blood-brain barrier. *Brain Res* 2011;1399:96 –115.

Strupp M, Schueler O, Straube A, Von Stuckrad-Barre S, Brandt T. Atraumatic Sprotte needle reduces the incidence of post-lumbar puncture headaches. *Neurology* 2001;57:2310-2312.

Swaiman, KF.; Ashwal, S. *Pediatric Neurology: Principles and Practice*. 3. St. Louis: Mosby; 1999.

Syrogianopoulos GA, Grivea IN, Anastassiou ED, et al. Sterile cerebrospinal fluid pleocytosis in young infants with urinary tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:927–30.

Tausch, HW.; Ballard, RA. *Avery's diseases of the newborn*. 7. Philadelphia: Saunders; 1998.

Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, et al. Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor-alpha, releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. *J Neuroinflammation* 2011;8:106.

Tam PKH, Dockray GJ, Lister J. Substance P concentrations in human cerebrospinal fluid vary inversely with age. *Neuroscience Letters*, 1985;54:327-332.

Tam PKH, Lister J. Elevation of cerebrospinal fluid substance P concentrations in spina bifida. *Z Kinderchir* 1984;39 Suppl 2:89-90.

Tanabe T, Otani H, Bao L, Mikami Y, Yasukura T, Ninomiya T, Inagaki C. Intracellular signaling pathway of substance P-induced superoxide production in human neutrophils. *Eur J Pharmacol*, 1996;299(1-3):187-195.

Tatemoto K, Lundberg JM, Jornvall H, & Mutt V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985;128(2):947-953.

Tattersall FD, Rycroft W, Cumberbatch M, Mason G, Tye S, Williamson DJ, Hargreaves RJ. The novel NK1 receptor antagonist MK-0869 (L- 754,030) and its water soluble phosphoryl prodrug, L-758,298, inhibit acute and delayed cisplatin-induced emesis in ferrets. *Neuropharmacology*, 2000;39(4):652-663.

Teichberg VI, Cohen S, Blumberg S. Distinct classes of substance P receptors revealed by a comparison of the activities of substance P and some of its segments. *Regul Pept*, 1981;1(5):327-333.

Thureson-Klein AK, and Klein RL. Exocytosis from neuronal large densecored vesicles. *Int Rev Cytol*, 1990;121:67-126.

Todd AJ, Sullivan AC. Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycin-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 1990;296:496–505.

Tohyama, M. (1992). An overview of the ontogeny of neurotransmitters and neuromodulators in the central nervous system. In A. Björklund, T. Hökfelt & M. Tohyama (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Ontogeny of Transmitters and Peptides in the CNS* (Vol. 10, pp. 647-650). Amsterdam: Elsevier.

- Tomkins O, Shelef I, Kaizerman I, et al. Blood-brain barrier disruption in post-traumatic epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:774 –777.
- Topaloglu AK, Kotan LD, Yuksel B. Neurokinin B signalling in human puberty. *J Neuroendocrinol*, 2010;22(7):765-770.
- Torfs H, Detheux M, Oonk HB, Akerman KE, Poels J, Van Loy T, Vanden Broeck J. Analysis of C-terminally substituted tachykinin-like peptide agonists by means of aequorin-based luminescent assays for human and insect neurokinin receptors. *Biochem Pharmacol*, 2002;63(9):1675-1682.
- Torrens Y, Beaujouan JC, Saffroy M, Glowinski J. Further evidence for the presence of "septide-sensitive" tachykinin binding sites in tissues possessing solely NK(1) tachykinin receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000;270(2):668-672.
- Tran AH, Berger A, Wu GE, Kee BL, Paige CJ. Early B-cell factor regulates the expression of Hemokinin-1 in the olfactory epithelium and differentiating B lymphocytes. *J Neuroimmunol*, 2011;232(1-2):41-50.
- Tregear GW, Niall HD, Potts JT, Jr., Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. *Nat New Biol*, 1971;232(29):87-89.
- Tremblay Y, Tretjakoff I, Peterson A, Antakly T, Zhang CX, & Drouin J. Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of a proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988;85(23):8890-8894.
- Tsuchida K, Shigemoto R, Yokota Y, Nakanishi S. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. *Eur J Biochem*, 1990;193(3):751-757.
- Turner RJ, Vink R. The roll of substance P in ischaemic brain injury. *Brain Sci* 2013;3: 123-142.
- Twardy BS, Channappanavar R, Suvas S. Substance P in the corneal stroma regulates the severity of herpetic stromal keratitis lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:8604–8613.
- Vaeroy H, Nyberg F, Franzen H, and Terenius L. Characterization of a substance P-Gly<sup>12</sup> amidating enzyme in human cerebrospinal fluid. *Biochemical and biophysical research communications* 1987;148(1):24-30.
- Vaeroy H, Helle R, Forre O, Kass E, Terenius L. Elevated CSF levels of substance P and high incidence of Raynaud phenomenon in patients with fibromyalgia: new features for diagnosis. *Pain*, 1988;32(1):21-26.
- van Giersbergen PL, Shatzer SA, Burcher E, Buck SH. Comparison of the effects of neuropeptide K and neuropeptide gamma with neurokinin A at NK2 receptors in the hamster urinary bladder. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1992;345(1):51-56.

Vanden Broeck J, Poels J, Simonet G, Dickens L, De Loof A. Identification of G protein-coupled receptors in insect cells. *Annals of the NY Academy of Science* 1998;839:123–128.

Verhage M, McMahon HT, Ghijsen WE, Boomsma F, Scholten G, Wiegant VM, and Nicholls DG. Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron*, 1991;6(4):517-524.

Vigna SR. The N-terminal domain of substance P is required for complete homologous desensitization but not phosphorylation of the rat neurokinin-1 receptor. *Neuropeptides*, 2001;35(1):24-31.

Vilijn M-H, Vaysse PJ-J, Zukin RS, Kessler JA. Expression of preproenkephalin mRNA by cultured astrocytes and neurons. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1988;85:6551–6555.

Villar AV, Goni FM, Alonso A, Jones DR, Leon Y, Varela-Nieto I. Phospholipase cleavage of glycosylphosphatidylinositol reconstituted in liposomal membranes. *FEBS Lett*, 1998;432(3):150-154.

Vink R, Donkin JJ, Cruz MI, Nimmo AJ, Cernak I. A substance P antagonist increases brain intracellular free magnesium concentration after diffuse traumatic brain injury in rats. *J Am Coll Nutr*, 2004;23(5):538S-540S.

Vink R, van den Heuvel C. Substance P antagonists as a therapeutic approach to improving outcome following traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 2010;7(1):74-80.

Von Euler US, & Gaddum, JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol*, 1931;72(1):74-87.

Wachi M, Okuda M, Togashi S, Miyashita O, Wakahoi T. Effects of methamphetamine administration on brain neurotensinlike immunoreactivity in rats. *Neuroscience Letters*, 1987;78:222–226.

Waitz R. Le liquide cephalorachidien du Nouveau-nt, *Rev Franc Pediatr* 1928;4:1.

Wakisaka S, Kajander KC, Bennett GJ. Increased neuropeptide (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. *Neuroscience Letters* 1991;124:200–203.

Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Wagner W and Dastyk J. HIF-1a Is Up-Regulated in Activated Mast Cells by a Process That Involves Calcineurin and NFAT. *J Immunol* 2008; 181:1665-1672.

Wall PD, Fitzgerald M. If Substance P fails to fulfil the criteria as a neurotransmitter in somatosensory afferents, what might be its function?. *Substance P in the Nervous System, Ciba Foundation Symp.* 1982;91:249-267.

Walsh DA, Hu EE, Mapp PI, Polar JM, Blake DR, Fan TP. Innervation and neurokinin receptors during angiogenesis in the rat sponge granuloma. *Histochem J* 1996;28:759-769.

Warth A, Kroger S, Wolburg H. Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol* 2004;107:311–318.

Weinstock JV, Blum A, Walder J, & Walder R. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. *J Immunol* 1988;141(3):961-966.

Weiss DW, Hirt R, Tarcic N, Berzon Y, Ben-Zur H, Breznitz S, O'Dorisio, TM. Studies in psychoneuroimmunology: psychological, immunological, and neuroendocrinological parameters in Israeli civilians during and after a period of Scud missile attacks. *Behav Med*, 1996;22(1):5-14.

Widell S. On the cerebrospinal fluid in normal children and in patients with acute abacterial meningo-encephalitis. *Acta Paediatr Suppl* 1958;47:1–102.

Williams BJ, Curtis NR, McKnight AT, Maguire JJ, Young SC, Veber DF, Baker R. Cyclic peptides as selective tachykinin antagonists. *J Med Chem*, 1993;36(1):2-10.

Williams R, Zou X and Hoyle GW. Tachykinin-1 receptor stimulates proinflammatory gene expression in lung epithelial cells through activation of NF- $\kappa$ B via a Gq-dependent Pathway. *American Journal of Physiology* 2007;292:L430–L437.

Willis CL. Glia-induced reversible disruption of bloodbrain barrier integrity and neuropathological response of the neurovascular unit. *Toxicol Pathol* 2011;39:172–185.

Wolf H, Hoepffner L. The cerebrospinal fluid in the newborn and premature infant. *World Neurol* 1961;2:871–8.

Wong CM, Boyle EM, Stephen RI, Smith J, Stenson BJ, McIntosh N and Laing IA. Normative values of substance P and neurokinin A in neonates. *Ann Clin Biochem* 2010;47:331-335.

Wozniak A, McLeman G, Betts WH, Murphy GA, Scicchitano R. Activation of human neutrophils by substance P: effect on FMLP-stimulated oxidative and arachidonic acid metabolism and on antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunology* 1989;68(3):287-292.

Wyers HJG, and Bakker JCW. De liquor cerebrospinalis van normale, a terme geboren neonat, *Maandschrift Kindergeneskunde* 1954;22:253.

Xu R, Feng X, Xie X, Zhang J, Wu D, Xu L. HIV-1 Tat protein increases the permeability of brain endothelial cells by both inhibiting occludin expression and cleaving occluding via matrix metalloproteinase-9. *Brain Res* 2012;1436:13–19.

- Yang B, Akhter S, Chaudhuri A, Kanmogne GD. HIV-1 gp120 induces cytokine expression, leukocyte adhesion, and transmigration across the blood-brain barrier: modulatory effects of STAT1 signaling. *Microvasc Res* 2009;77: 212–219.
- Yang H. Nanoparticle-mediated brain-specific drug delivery, imaging, and diagnosis. *Pharm Res* 2010;27:1759-1771.
- Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke* 2011;42: 3323–3328.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid B protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 1990;250:279-281.
- Young WSI, 1990. In situ hybridization histochemistry. In: Björklund A, Hokfelt T, Wouterlood FG, Van den Pol AN (Eds.) *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 8. Elsevier, Amsterdam, pp. 481–512.
- Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, et al. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Sci Transl Med* 2011;3:84ra44.
- Yuan M, Wen-Xia Z, Jun-Ping C, Yong-Xiang Z. Age-related changes in the oestrous cycle and reproductive hormones in senescence-accelerated mouse. *Reprod Fertil Dev*, 2005;17(5):507-512.
- Zakarian, S & Smyth, D. Distribution of active and inactive forms of endorphins in rat pituitary and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979;76(11):5972-5976.
- Zaoutis, LB.; Chiang, VW. *Comprehensive pediatric hospital medicine*. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007.
- Zachrisson O, Lindefors, Brene S. A tachykinin NK1 receptor antagonist, CP-122,721-1, attenuates kainic acid-induced seizure activity. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998;60(2):291-295.
- Zhang C, Kwan P, Zuo Z, Baum L. The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:930-942.
- Zhang X, Cortés R, Villar M, Morino P, Castel M-N, Hokfelt T. Evidence for upregulation of galanin synthesis in rat glial cells in vivo after colchicine treatment. *Neuroscience Letters*, 1992;145:185–188.
- Zhang X, Dagerlind A, Elde RP, Castel MN, Broberger C, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T. Marked increase in cholecystokinin B receptor messenger RNA levels in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy. *Neuroscience*, 1993;57:227–233.
- Zhang X, Shi T-J, Holmberg K, Landry M, Huan W, Xiao H, Ju G, Hokfelt T. Expression and regulation of the neuropeptide Y Y2 receptor in sensory and autonomic ganglia. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 1997;94:729–734.

Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T. Effect of peripheral axotomy on expression of neuropeptide Y receptor mRNA in rat lumbar dorsal root ganglia. *European Journal of Neuroscience*, 1994;6:43–57.

Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, & Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol*, 2000;1(5):392-397.

Zhang Y, Paige CJ. T-cell developmental blockage by tachykinin antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis. *Blood*, 2003;102(6):2165-2172.

Zhou Q, Nyberg F. Injection of substance P (SP) N-terminal fragment SP(1-7) into the ventral tegmental area modulates the levels of nucleus accumbens dopamine and dihydroxyphenylacetic acid in male rats during morphine withdrawal. *Neurosci Lett*, 2002;320(3):117-120.

Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA. NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. *Br J Pharmacol*, 1990;100(1):11-14.

Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*, 1990;40(2):264-278.

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, and Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994;94:2036-2044.

Zimmer G, Rohn M, McGregor GP, Schemann M, Conzelmann KK, & Herrler G. Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J Biol Chem*, 2003;278(47):46854-46861.

Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008;57:178-201.

Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci* 2011;12:723–738.



**CONSENTIMIENTO INFORMADO para:  
Determinación de niveles del neuropéptido Sustancia P  
en muestras de LCR de neonatos.**

Nº HISTORIA.....  
DON/DOÑA.....  
DE..... AÑOS DE EDAD, CON DOMICILIO EN.....  
Y D.N.I. Nº..... EN CALIDAD DE.....  
DE.....

**DECLARO:**  
**QUE EL DR/A.....**

Me ha explicado que mi hijo precisa de la realización de un procedimiento diagnóstico denominado punción lumbar para descartar una posible afectación meníngea como extensión del proceso infeccioso que padece en la actualidad. Este procedimiento es necesario para actuar terapéuticamente lo antes posible en base a sus resultados y evitar así posibles secuelas neurológicas. La técnica consiste en la punción con aguja fina de un espacio intervertebral en la zona lumbar, y la extracción de una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR). Además de la muestra necesaria para el diagnóstico y actitud terapéutica precoz, con este documento solicitamos su consentimiento para tomar 10 gotas más para la realización de un Estudio de Investigación. Se trata de un estudio que tiene como objetivo la determinación del neuropéptido conocido como Sustancia P (SP) en una muestra de LCR con el fin de determinar sus valores normales en los recién nacidos, desconocidos en este momento, y que esperamos sean útiles en el futuro para una mejor actuación médica en todos estos procesos patológicos.

Es importante destacar que con la toma de esta muestra no se puede considerar que exista un riesgo "extra" aparte del que entraña toda punción lumbar.

La identificación de la muestra será alfa numérica e impersonal, solo se asociarán datos clínicos pero sin posibilidad de identificación de la madre y del recién nacido.

He comprendido que las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado. También comprendo, que en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación puedo revocar el consentimiento que ahora presto. Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida, y en tales condiciones

**CONSIENTO**

En la extracción de 10 gotas más de LCR para el estudio de investigación para el análisis de la Sustancia P, así como de la toma de datos clínicos para su posterior análisis y correlación.

En.....(LUGAR Y FECHA)

Fdo: EL/LA MÉDICO

Fdo: EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

## REVOCACIÓN

DON/DOÑA.....  
DE..... AÑOS DE EDAD, CON DOMICILIO EN.....

..... Y D.N.I N°.....  
EN CALIDAD DE..... DE.....

REVOCO el consentimiento prestado en fecha....., y no deseo  
proseguir el estudio, que doy con esta fecha por finalizado.

En..... (LUGAR Y FECHA)

Fdo.: EL/LA MÉDICO

Fdo.: EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

