

Endocrinología básica

61

ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN LINFOCITARIA T REGULADORA CD4+FOXP3+ EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y ANEMIA PERNICIOSA

B. Soldevila^a, N. Alonso^a, M.J. Martínez Arconada^b, I. Salinas^a, E. Aguilera^a, M.L. Granada^c, A. Sanmartí^a y E.M. Martínez-Cáceres^b

^aServicios de Endocrinología y Nutrición, ^bInmunología (LIRAD-BST) y ^cBioquímica Clínica. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona.

Introducción: En la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) existe una prevalencia aumentada de anemia perniciosa (AP). Las células reguladoras naturales CD4⁺CD25⁺ (nTreg) suprimen la respuesta autoinmunitaria, pero su mecanismo de acción es poco conocido. Su marcador molecular específico es el factor de transcripción FoxP3. En la gastritis autoinmunitaria, modelo experimental de AP, mediada por LT CD4⁺ T helper1, las nTreg han demostrado intervenir en la supresión de la enfermedad.

Objetivo: Analizar si los pacientes con DM1 y AP (DM1+AP) presentan alteraciones en la subpoblación nTreg que favorezcan la aparición de AP comparado con dos grupos: DM1 sin otras enfermedades autoinmunitarias (EA) y controles sanos.

Pacientes: 16 con DM1+AP (10 mujeres; $36,6 \pm 12,8$ años; HbA1c $7,6 \pm 0,7\%$), 16 con DM1 sin EA ($37,4 \pm 12,6$ años, HbA1c $7,7 \pm 1,1\%$), 16 controles ($35,6 \pm 13,4$ años).

Métodos: 1) Marcadores de afectación de la mucosa gástrica: Pepsinógeno I (ELISA) y gastrina (RIA); 2) Estudio inmunológico: Porcentaje células nTreg en sangre periférica por inmunofluorescencia (marcadores CD4, CD25, CD27 y FoxP3) y análisis por citometría de flujo. La HbA1c (HPLC) se determinó en los DM1. En 12 de los DM1+AP se practicó una fibro-gastroscopia con biopsia gástrica.

Resultados: 1) *Pacientes DM1+AP vs DM1:* Incremento en el porcentaje de LT CD4⁺CD27⁺FoxP3⁺ ($7,23 \pm 1,72$ vs $5,3 \pm 1,7$; $p = 0,003$) y CD4⁺CD25⁺CD27⁺FoxP3⁺ ($3,62 \pm 1,1$ vs $2,81 \pm 0,91$; $p = 0,048$) 2) *Pacientes con DM+AP vs Controles:* Incremento en el porcentaje de LT CD4⁺CD27⁺FoxP3⁺ ($7,23 \pm 1,72$ vs $5,36 \pm 1,31$; $p = 0,004$) 3) *Pacientes DM1 vs Controles:* Sin diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados.

Conclusiones: A diferencia de lo observado en modelos animales, se ha objetivado un incremento en sangre periférica de la población nTreg en los pacientes con DM1+AP en comparación con los grupos sin AP (DM1 y controles). Se continuarán estudios funcionales de estas células nTreg en el control de la respuesta autoinmunitaria en la AP.

62

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS PATOLOGÍAS ATENDIDAS EN UNA CONSULTA AMBULATORIA DE ENDOCRINOLOGÍA Y SU RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL

A. Segura Galindo, D. Sorando Pérez y A. Avilés de Miguel
Unidad de Endocrinología Hospital Virgen de la Torre Área 1 Madrid.

Objetivo: Analizar las patologías que han motivado atención médica y su relación con el índice de masa corporal (IMC) en siete días consecutivos de consulta.

Materiales y métodos: Se valoraron 259 pacientes, 205 mujeres (79,2%) y 54 varones (20,8%), la edad, el IMC y el motivo por el que fueron remitidos a la consulta de endocrinología. Para la obtención de los resultados estadísticos se utilizó el programa SPSS.

Resultados: Edad media: 56,4 años (16-85) Ds 15,663. IMC: 29,446 kg/m² (17,5-55,3) Ds 6,40. El 60,2% fueron atendidos por patología tiroidea, 30,4% por diabetes (5,2% diabéticos tipo 1), 4,4% por obesidad, 2,7% por patología del metabolismo fosfocalcico, 1,5% por hipercolesterolemia, 0,4% por patología hipofisaria y 0,4% por patología suprarrenal.

	N	Mínimo	Máximo	Media	DS
IMC	259	17,5	55,3	29,446	6,4
Mujeres	205	17,5	55,3	29,746	6,76
Varones	54	18,5	44,9	28,292	4,76
Diabéticos		18,5	44,9	29,972	6,13
Patología tiroidea		17,5	50,5	28,03	5,6

Edades agrupadas

16-26 años	1,20%
26-26 años	10,50%
36-46 años	17,40%
46-56 años	20,50%
56-66 años	18,20%
66-76 años	23,30%
76-85 años	8,90%

IMC

Bajo peso	0,40%
Normopeso	23,90%
Sobrepeso	38,60%
Obesidad grado I	21,50%
Obesidad grado II	10%
Obesidad grado III y IV	5,60%

Patología tiroidea

Hipotiroidismos primarios	23,20%
Hipotiroidismo subclínico	17,90%
Hipotiroidismo postcirugía t post yodo 131	15,90%
Hipotiroidismo subclínico	13,90%
Cánceres tiroideos	7,90%
Bocios nodulares	4%
Bocios operados	17,20%

Conclusiones: 1. La patología endocrinológica encontrada es más frecuente en el sexo femenino y en una edad, media avanzada. 2. Las dos patologías prevalentes son en primer lugar la tiroidea y en segundo la diabetes. 3. Un gran porcentaje de los pacientes se encuentran en sobrepeso y obesidad, llamando la atención el bajo número que consultaron por este motivo, lo que indicaría una falta de concienciación de esta patología por parte del médico que lo remite y del propio paciente. 4. No existen diferencias llamativas entre el IMC de las dos patologías principales. 5. La patología tiroidea muestra una gran variedad lo que podría indicar que esta patología todavía es tratada directamente por el endocrino. 6. El alto porcentaje de tiroides frente al de diabetes podría relacionarse con que una gran parte de los diabéticos son tratados en Atención Primaria, siendo motivo de reflexión la edad media alta con que son derivados al endocrino. 7. El resto de patología endocrina vista no es variada, ni numerosa, pudiendo relacionarse con que el análisis ha sido realizado en una consulta ambulatoria de endocrinología.

63**APROXIMACIÓN A LA DETERMINACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN DEL RECEPTOR DE LA GHRELINA GHS-R1A UTILIZANDO RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Y. Pazos^a, A. de Capua^b, M. Martín-Pastor^b, C. Álvarez-Pérez^c y F.F. Casanueva^c

^aÁrea de Investigación. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela.

^bLaboratorio Integral de Dinámica y Estructura de Biomoléculas José R. Carrasco, Unidad de Resonancia Magnética, RIAIDT, Universidad de Santiago de Compostela.

^cLaboratorio de Endocrinología Molecular y Celular.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina.

Universidad de Santiago de Compostela.

La ghrelina humana es el ligando endógeno del receptor de secretagogos de hormona de crecimiento (GHS-R), es un péptido de 28 aminoácidos en el que la Ser-3 está modificada con una *n*-octanoilación. Esta nueva hormona peptídica no sólo está implicada en la secreción de GH sino también en la regulación de la ingesta. El descubrimiento de la ghrelina abre un nuevo campo para el estudio de la relación de ghrelina con enfermedades metabólicas.

Hasta el momento, sólo se han realizado estudios de espectrometría de masas y estudios estructurales de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de la ghrelina libre en disolución desconociéndose sus interacciones con sus posibles receptores. La RMN es hoy una herramienta habitual en el estudio de las interacciones que se producen entre un ligando y un receptor biomolecular que ha sido previamente aislado y purificado. Recientemente se ha acuñado el término “*in cell NMR*” para referirse a los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) con células vivas en el tubo de RMN. Estos experimentos pueden servir para determinar la interacción entre un ligando y un receptor presente en la propia estructura celular, y en casos favorables conocer el epítopo de unión.

En este trabajo se ha aplicado “*in cell NMR*” al estudio de la interacción ghrelina con el receptor GHS-R1a de la membrana

celular. Se han utilizado células HEK-293 transfectadas de forma estable con el receptor de ghrelina (GHS-R1a) y células HEK-293-WT como control negativo. Las diferencias observadas entre los experimentos de RMN 1D y 2D de la ghrelina frente a un número creciente de células transfectadas frente a los experimentos análogos con células “wild type”, probaron la interacción ligando-receptor e identificaron algunos residuos del ligando implicados en el reconocimiento. En particular se han identificado cambios en las señales de ¹H-RMN del grupo *n*-octanoilo de la Ser-3 de la ghrelina.

64**EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE RECEPTOR DE SECRETAGOGOS DE (GHSR) EN LA HIPÓFISIS DE RATONES TRANSGÉNICOS**

L.M. Seoane^a, D. Carmignac^b, F.F. Casanueva^a e I.C.A.F. Robinson^b

^aLaboratorio de Endocrinología Molecular. Hospital Clínico Universitario Santiago de Compostela. ^bDivision of Molecular Neuroendocrinology, National Institute for Medical Research, London.

La expresión de GHSR, un receptor endógeno para ghrelina, ha sido encontrada en hipófisis pero los niveles de expresión de este receptor son bajos y el papel fisiológico de GHSR sobre la regulación de la secreción de GH y prolactina no está todavía claro. Usamos una línea de ratones transgénicos para analizar los efectos de la sobreexpresión de hGHSR en células productoras de GH en la hipófisis. También cruzamos estos ratones con otros ratones transgénicos para GH-GFP con células somatotropas fluorescentes.

Objetivos: 1) Obtención de una línea de ratones doblemente transgénicos GH-GFP x hGHS-R, 2) Estudios de colocalización 3) Estudios fisiológicos.

Métodos: PCR. Radioinmunoensayo de GH y prolactina. Inmunohistoquímica.

Resultados: La sobreexpresión de GHSR en hipófisis no afectó al peso corporal, el contenido de GH hipofisario en ratones transgénicos fue más bajo que en ratones wild type. Por inmunohistoquímica encontramos que solamente una pequeña proporción de células somatotropas coexpresan GH y GHSR y esto se observó de igual manera en machos y hembras. En ratones wild type conseguimos mostrar colocalización entre GHSR y prolactina, en secciones hipofisarias y en células hipofisarias aisladas. Esto sugiere que el GHSR ejerce un papel directo en la regulación de la función lactotropa, lo que concuerda con resultados previos obtenidos en ratas dwarf.

Conclusiones: Ratones transgénicos sobreexpresando GHSR presentan contenidos hipofisarios de GH bajos, esto no afecta al peso corporal o al contenido hipofisario de prolactina. Las células hipofisarias que expresan GHSR expresan también GH y/o prolactina, y esto último sugiere que GHSR está afectando a la fisiología de la prolactina.

65**ERK SE AUTORREGULA A TRAVÉS DE DARPP-32 EN CÉLULAS TIROIDEAS**

M.A. Zaballos^a, P. Santisteban^a y C. García-Jiménez^b

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC.

^bUniversidad Rey Juan Carlos. Madrid.

Nuestro grupo ha demostrado previamente que la expresión de la proteína DARPP-32 (Dopamine and cAMP regulated neuronal Phosphoprotein, 32Kd) es necesaria para la diferenciación

de células tiroideas, que su expresión se induce por tirotropina (TSH) e IGF-1 y que su depleción mediante ARN de interferencia conduce a la pérdida de expresión de los factores de transcripción TTF-1 y Pax8 y consecuentemente de los marcadores finales de diferenciación Tiroglobulina y NIS.

El **Objetivo** de este trabajo ha sido estudiar las posibles variaciones de DARPP-32 en células tiroideas al estimular su proliferación con suero o mediante su transformación con el onco-gén Ras.

Nuestros **Resultados** indican que los niveles de DARPP-32 (proteína y ARNm) presentes en células FRTL-5 quiescentes se reducen tras la estimulación con suero. Este efecto está mediado por la proteína ERK1/2 fosforilada (P) ya que la inhibición específica de MEK con U0126 previene parcialmente la depleción dependiente de suero de DARPP-32. En segundo lugar, en células transformadas con los oncogenes H-ras o K-ras, que presentan una proliferación muy elevada, los altos niveles de P-ERK correlacionan con niveles muy bajos o indetectables de DARPP-32 respectivamente. En tercer lugar la inactivación de la vía de P-ERK en clones de células tiroideas que expresan de manera estable un dominante negativo de MEK resulta en la sobreexpresión de DARPP-32. También hemos generado clones de células tiroideas que expresan una forma constitutivamente activa de MEK y en ellos los niveles de DARPP-32 son indetectables. Finalmente esta regulación negativa P-ERK/DARPP-32 es mútua puesto que el silenciamiento de DARPP-32 mediante la transfección de un ARN de interferencia específico resulta en la inactivación de ERK.

En **Conclusión**: Los niveles de DARPP-32 en el tirocito disminuyen en respuesta a estímulos proliferativos como el suero o la transformación y aumentan con la diferenciación. En este trabajo describimos el hallazgo de un bucle de regulación negativa en el tirocito en el que P-ERK facilita la depleción de DARPP-32, evento que conduce a la disminución de los niveles de P-ERK. Se trataría de la primera descripción de un bucle de autorregulación negativa de ERK mediada por DARPP-32. Nuestros resultados sugieren que el papel integrador de DARPP-32 es importante en el equilibrio transduccional que media la decisión de proliferación/diferenciación o transformación del tirocito.

66

ESTUDIO DE LA DIFERENTES RELACIONES ENTRE LOS RECEPTORES SOLUBLES DEL TNF-ALPHA 1 Y 2, LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y LA FUNCIÓN ENDOTELIAL

E. Esteve Lafuente^a, A. Castro Guardiola^b, A. López-Bermejo^a, B. Chico Juliá^a, W. Ricart Engel^a y J.M. Fernández-Real Lemos^a

^aUnidad Diabetes y Endocrinología, ^bServicio de Medicina Interna. Hospital Josep Trueta. Girona.

Objetivo: El factor de necrosis tumoral alpha (TNF-alpha) es una citoquina proinflamatoria implicada en la patogénesis de la disfunción endotelial y la insulina resistencia. El objetivo de este estudio fue evaluar si las fracciones solubles del receptor del TNF-alpha 1 y 2 (sTNFR1 y sTNFR2), las cuales reflejan la actividad de esta citoquina, podrían explicar los complejos efectos del TNF-alpha sobre la función endotelial de manera independiente a la resistencia a la insulina.

Material y métodos: Las concentraciones plasmáticas de sTNFR1 y sTNFR2 fueron medidas mediante EASIA en 100 sujetos no diabéticos (30 de ellos con intolerancia a la glucosa oral). Se analizó la sensibilidad a la insulina mediante *minimal model* y la reactividad vascular en el brazo por medio de ecodoppler de alta resolución.

Resultados: En los sujetos con tolerancia normal a la glucosa, las concentraciones plasmáticas de sTNFR1 se asociaron positivamente con la vasodilatación dependiente de endotelio ($r = 0,291, p = 0,02$). De hecho, los valores séricos de sTNFR1 contribuyeron de manera independiente a la vasodilatación dependiente de endotelio tras ajustar por edad, presión arterial sistólica y diabólica, IMC, tabaco, y sensibilidad a la insulina ($p = 0,002$). Por el contrario los valores plasmáticos de sTNFR2 se correlacionaron negativamente con la vasodilatación dependiente de endotelio en todo el grupo de sujetos (tendencia $r = -0,190, p = 0,058$) y en particular en los que presentaban intolerancia a la glucosa oral ($r = -0,366, p = 0,047$). No se evidenció ninguna relación entre la vasodilatación independiente de endotelio y los valores séricos de sTNFR1 o sTNFR2.

Conclusiones: Las concentraciones plasmáticas de sTNFR1 y sTNFR2 podrían explicar los complejos efectos del TNF-alpha sobre la función endotelial.

67

ESTUDIO DE LAS SEÑALES IMPLICADAS EN LA ESPECIFICACIÓN TIROIDEA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

P. Recacha y P. Santisteban

Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC-UAM) - Madrid

Uno de los temas importantes y todavía no resueltos dentro de la organogénesis, es como se produce la especificación tiroidea. En el día E8,5 dpc del desarrollo embrionario del ratón, comienza la expresión de los factores de transcripción tiroideos (TTF-1/Nkx2.1, TTF-2/Foxe1 y Pax-8), en una zona del endodermo cercana al primordio cardiaco. Esta zona se diferenciará para dar lugar al tiroides mediante un complejo mecanismo que se completa el día 15,5 dpc. Las señales por las cuales, estas células empiezan a expresar los factores de transcripción tiroideos no se conocen hasta el momento, pero lo que si se sabe es que entre los días 8,5 y 15,5 hay muchas señales cruzadas entre el endodermo y el mesodermo, habiéndose demostrado que el mesodermo cardiogénico secreta morfógenos, como FGF's, que contribuyen al desarrollo de órganos, como el páncreas y el hígado. Debido a este hecho se ha hipotetizado que las señales que dan lugar a esta especificación deben proceder del exterior del primordio tiroideo. Las señales candidatas serían las mismas que se han descrito en el desarrollo embrionario general, entre las que destacan Wnt/βcatenina y Sonic hedgehog (Shh), por ser importantes morfógenos, así como algunos factores de crecimiento como FGFs e IGFs.

El objetivo de este trabajo ha sido el estudio del papel de estos factores de crecimiento y de la ruta Shh en el control de la especificación tiroidea, ya que se ha descrito que el ratón knock out para Shh tiene hemiagenesia de tiroides y además es también importante para que se inicie la expresión de TTF-1 en el cerebro anterior.

Para identificar las señales que dan lugar al desarrollo tiroideo, hemos puesto a punto un sistema de cultivo de explantes de endodermo ventral, de embriones de ratón de 8,5 dpc (6-8 somitas). Los explantes se incuban en placas collagenizadas en un medio rico en suero y se tratan con Shh y factores de crecimiento como IGF-1 y FGF-2. Por otra parte, usamos cortes de embriones obtenidos en el mismo estadio de desarrollo para estudiar la expresión de los genes específicos tiroideos así como diferentes componentes de la ruta Shh por ensayos de inmunofluorescencia e hibridación in situ. También usamos RT-PCR para estudios de expresión. Nuestros resultados indican que el tratamiento con el factor de crecimiento IGF-1, reduce la expresión de los factores de transcripción de la ruta Shh, llamados Gli (Ci en Drosophila). Debido a que no se encuentra Shh en el tiroides en desarrollo, pero si sus factores de transcripción, estos resultados indicarían una comunicación cruzada en-

tre la vía de señalización de estos factores de crecimiento y la ruta de Shh. Este modelo abre un abanico de estudios importante que nos ayudará a estudiar los mecanismos involucrados en la organogénesis tiroidea y a comprender mejor patologías como el hipotiroidismo congénito.

Este trabajo ha sido financiado con proyectos del MEC (BFU2004-03169-BMC y FIS (RCMN C03/08, RGDM G03/10) y PIO 42374

68

GHRH COMO POSIBLE LIGANDO DEL RECEPTOR GHS-R1A DE LA GHRELINA

M.C. Carreira^a, J.P. Camiña^b, J. Fernández Campos^a, O. Al Massadi, M. Lage^a y F.F. Casanueva^a

¹Laboratorio de Endocrinología Molecular y Celular. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. ²Área de Investigación. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela.

En este trabajo se analizó la posible interacción entre GHRH y GHS-R1a así como la consiguiente ruta de señalamiento intracelular. Los resultados obtenidos mostraron que GHRH provocó, de forma dependiente de dosis, una movilización de calcio a partir de los depósitos intracelulares seguida de una entrada de calcio a través de canales de calcio situados en la membrana plasmática en células HEK 293 transfectadas establemente con el receptor GHS-R1a (HEK-GHSR1a), efecto que no se observó en células HEK 293. Estudios de unión marcada radioactivamente y 'cross-linking' revelaron que la señal de calcio inducida por GHRH era mediada por el receptor GHS-R1a. Además, la presencia de GHRH aumentó la capacidad de unión de ghrelina al receptor. La administración de GHRH estimuló la producción de los segundos mensajeros AMPc y IP₃. Curiosamente, GHRH presentó también un efecto potenciador de la movilización de IP₃ inducido por la ghrelina. Además, ensayos de microscopía confocal realizados en células CHO transfectadas con GHS-R1a-EGFP mostraron que GHRH fue capaz de provocar la endocitosis de dicho receptor 120 minutos después de su administración. En conclusión, los datos presentados en este trabajo sugieren que GHRH es capaz de activar el GHS-R1a induciendo un incremento tanto en la capacidad de unión de ghrelina al receptor como su respuesta celular.

Este trabajo ha sido financiado por el FIS y el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Red de Grupos RGTO (G03/028), Red de Centros (C03/08).

69

LA ESTIMULACIÓN DE MAPK POR EL RECEPTOR DE LA GHRELINA GHS-R1A REQUIERE LA ENDOCITOSIS DEL RECEPTOR. INTERDEPENDENCIA ENTRE B-ARRESTINA-2 Y LA PROTEÍNA G_i

M. Lodeiro-Pose^a, O. Ischenko^a, A. Carolina Martini^{a,b}, S. Pérez Romero^a, M. Lage^a, F.F. Casanueva^a y J.P. Camiña^c

^aLaboratorio de Endocrinología Molecular. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. ^bInstituto de Fisiología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba-Argentina. ^cÁrea de Investigación. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago. Santiago de Compostela.

El receptor de secretagogos de GH tipo 1a (GHS-R1a) media la acción de la ghrelina, un péptido acetilado de 28 aminoácidos, que participa en la secreción de la hormona de crecimiento, así

como de prolactina y corticotropina en la hipófisis anterior. Además la ghrelina ejerce otras funciones periféricas que abarcan efectos sobre la proliferación celular a través de la activación de la cascada de señalización de las MAPK.

En este trabajo, se ha estudiado la regulación de la vía de las MAPK en asociación con la internalización del receptor GHS-R1a. Se ha utilizado como modelo experimental la línea celular HEK 293 transfectadas de forma estable con el receptor GHS-R1a. En este modelo, la ghrelina activa la fosforilación de ERK 1/2 a través de dos vías diferentes, una dependiente de la activación de la proteína G_i y la otra dependiente de la β-arrestina-2.

La activación de la ruta dependiente de la proteína G_i implica la activación de la tirosina quinasa cSrc, la cual es activada a través de la PI3K y la PKC novel PKCε. Por otra parte, la vía dependiente de β arrestina 2 implica la unión y activación de la tirosina quinasa cSrc la cual inicia la formación de un complejo proteico constituido por GHS-R1a/ β arrestin-2/cSrc/Raf-1/MEK que acopla y activa ERK 1/2. La formación de este complejo parece dependiente del proceso de internalización del receptor GHS-R1a mediado por la ghrelina.

La existencia de estas dos vías de señalización determinan la cinética de activación de ERK 1/2, caracterizada para el caso de la ghrelina por presentar un pico de activación máxima a los 5-10 minutos tras la estimulación, que es seguido por una disminución suave manteniéndose valores elevados de fosforilación durante 60 min post-estímulo.

La existencia de esta diferencia de regulación del patrón temporal y espacial para la activación de ERK 1/2 a través de estas dos vías implicaría la existencia de papeles fisiológicos claramente diferenciados.

Este trabajo ha sido financiado por el FIS y el Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo, Red de Grupos RGTO (G03/028), Red de Centros (C03/08).

70

LA NEUTRALIZACIÓN DEL TNF-α CIRCULANTE ATENÚA LA PÉRDIDA DE PESO CORPORAL Y LA PÉRDIDA DE TEJIDO ADIPOSO PERO NO LA PROTEOLISIS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO INDUCIDA POR LA ARTRITIS EXPERIMENTAL

M. Granado, T. Priego, A.I. Martín, E. Castillero, M.A. Villanúa y A. López-Calderón

La caquexia inflamatoria inducida por la artritis experimental se acompaña de una disminución de la secreción de GH e IGF-I y de la expresión del gen del IGF-I en el hígado. El objetivo de nuestro trabajo fue dilucidar el papel del TNF-α en las alteraciones del eje GH-IGF-I, del peso corporal y de la proteolisis muscular inducida por la artritis crónica. La artritis se indujo en ratas macho adultas, mediante una inyección intradérmica de adyuvante de Freund. En el día 14 post-inyección, cuando los animales comenzaron a desarrollar los síntomas externos de la enfermedad, tanto las ratas controles como las artríticas se dividieron en dos grupos; 1) inyectado durante 8 días con la forma soluble del receptor tipo 1 del TNF-α (PEG-sTNFR1, Amgen) para neutralizar el TNF-α circulante, y 2) tratado con solución salina. La artritis disminuyó el peso del músculo esquelético, mientras que aumentó la expresión en el músculo de los genes del TNF-α del IGF-I, de la IGFBP-5 y de los atrofígenes MuRF1 y MaFbx implicados en la proteolisis del músculo esquelético. La neutralización del TNF-α disminuyó el índice de artritis (P < 0,01), la inflamación articular (P < 0,01) y atenuó el efecto inhibidor de la artritis sobre el peso corporal y el tejido adiposo. Sin embargo, en las ratas artríticas la administración del PEG-sTNFR1 no previno la atrofia muscular ni el aumento de la expresión de los atrofígenes MuRF1 y MaFbx y del gen del

TNF- α inducidos por la artritis. La administración del PEG-sTNFR1, aunque atenuó el efecto de la artritis sobre la expresión de los genes de la GH en la hipófisis y del IGF-I en el hígado, no modificó los efectos de la artritis sobre la expresión de los genes del IGF-I y de la IGFBP-5 en el músculo esquelético. En base a estos resultados podemos concluir que el bloqueo del TNF- α circulante en la artritis experimental tiene un efecto beneficioso sobre la inhibición de la expresión de los genes del IGF-I en el hígado y de la GH en la hipófisis pero no sobre la atrofia muscular la cual no parece estar mediada por el aumento del TNF- α circulante sino por el TNF- α local o por alguna otra vía.

Este trabajo ha sido financiado por una CICYT (BFI 2003-02/49), por una beca FPU a Miriam Granado (AP2003-2564) y por una beca FPU a Teresa Priego (AP2001-0053)

71

LA OBESTINA ACTIVA LA PROLIFERACIÓN - DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO RETINIANO HUMANO

J. Fernández Campos^a, M. Lodeiro-Pose^a, S. Pérez Romero^a, M. Lage^a, F.F. Casanueva^a y J.P. Camiña^b

^aLaboratorio de Endocrinología Molecular. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. ^bÁrea de Investigación. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago. Santiago de Compostela.

La proliferación de las células del epitelio pigmentario retiniano (hRPE) ejerce un papel significativo en varios desórdenes proliferativos asociados a la retina que conllevan a la pérdida de la visión, tales como la vitreoretinopatía proliferativa. En este trabajo, se ha evaluado el papel mitogénico de la obestatina en las células hRPE. La obestatina es un péptido de 23 aminoácidos codificado por el mismo gen de la ghrelina cuya acción está mediada a través del receptor GPR39, perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G. En una primera aproximación, se determinó la presencia del receptor GPR39 en cultivos primarios de células hRPE obtenidas de diferentes donantes por medio de RT-PCR. Posteriormente, se investigó los efectos de la obestatina sobre la movilización de calcio intracelular, aunque los resultados obtenidos descartaron que esta hormona activase vía alguna del calcio en las células hRPE. Sin embargo, la obestatina estimula la proliferación celular de estas células, efecto que fue evaluado mediante recuento celular, a los tres y seis días de estimulación. Dicho efecto proliferativo parece estar mediado por la vía de las MAPK. Se han iniciado los estudios sobre la regulación de la vía de las MAPK en asociación con la internalización del receptor GPR39. Los resultados preliminares muestran que la obestatina activa la fosforilación de ERK 1/2 a través de una vía dependiente de la proteína G_i que implica la activación de la tirosina quinasa cSrc, la cual es activada. Se descartó la participación de la vía G_a a través de la PI3K/AC/PKA. Paralelamente se pudo constatar como la obestatina estimula la activación de PKC noveles, PKC ϵ y PKC δ , aunque estas no parecen estar implicadas en la activación de ERK 1/2. Curiosamente estas células secretan obestatina, lo que determina que esta hormona tiene un papel autocrino sobre las mismas. Estas observaciones contribuyen al conocimiento de los factores mitogénicos implicados en las actividades asociadas a las células hRPE. Ello abre no solo una nueva función para la obestatina, sino también que esta hormona pudiera estar implicada en la patogénesis de los procesos proliferativos anormales del ojo. La obestatina se une al grupo de factores que activan la proliferación de estas células, de entre los que destacan el EGF, bFGF, IGF-I, PDGF, HGF y VEGF.

72

MECANISMO DE LA INHIBICIÓN NO GENÓMICA DEL ESTRADIOL SOBRE EL "GNRH SELF-PRIMING" INDUCIDO POR EL TAMOXIFÉN EN EL GONADOTROPO

J.C. Garrido-Gracia^a, C. Bellido^a, R. Aguilar^a, I. Barranco^b, Y. Millán^b, J. Martín de las Mulas^b y J.E. Sánchez-Criado^a

^aDepartamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba. ^bDepartamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Universidad de Córdoba.

La administración de tamoxifén (TX) en ausencia de estrógenos (E), induce en la rata GnRH self-priming, la capacidad del GnRH, dependiente del receptor de progesterona (RP), de aumentar su propia respuesta en el gonadotropo. El RP dependiente de E puede ser fosforilado o activado por progesterona (P) y, en ausencia del ligando endógeno, mediante rutas intracelulares activadas por el GnRH (AMPc/PKA). El estradiol 17beta (E₂), actuando sobre un receptor de estrógenos (RE) alfa de membrana en el gonadotropo, inhibe esta acción agonista del TX. En el presente trabajo hemos investigado el mecanismo por el cual el E₂ inhibe el GnRH self-priming inducido por el TX en incubación de fragmentos hipofisarios de ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas con TX y en cultivos de células adenohipofisarias en presencia de TX. Los resultados mostraron que: (i) además del efecto inhibidor sobre el GnRH self-priming generado por el TX, el E₂ bloqueó el aumento generado por la P y el activador de la adenilciclase forskolina sobre la secreción de LH estimulada por GnRH; (ii) el E₂ no afectó al aumento que generó el TX sobre la expresión del RP en el gonadotropo o al contenido de AMPc en la hipófisis; y (iii) la inhibición de las fosfatases con ácido okadaico suprimió la inhibición del E₂ sobre el aumento que genera el TX en la secreción de LH estimulada por el GnRH, y la estimulación de las fosfatases con ceramida bloqueó el GnRH self-priming inducido por el TX. En conjunto, estos resultados indican que la inhibición del E₂, mediada por el RE de membrana, sobre el GnRH self-priming inducido por el TX estaría relacionado más con un bloqueo de la activación del RP, tanto dependiente de P como independiente del ligando, que con una respuesta deficiente del RP a las fosforilasas. Los resultados también sugieren que el efecto inhibidor del E₂ sobre el GnRH self-priming inducido por el TX se ejerce a través de la modulación de la actividad fosfatasa en el gonadotropo.

Financiado con fondos de la DGICYT (BFU2005-01443 y AGL2003-06289).

73

MECANISMO MOLECULAR DE LA ACCIÓN DEL LPA SOBRE LA SECRECIÓN DE GHRELINA EN LA LÍNEA CELULAR AGS

C. Álvarez-Pérez^a, M. Lage^a, M.L. Seoane^b, F.F. Casanueva^a y Y. Pazos^b

La ghrelina es un péptido de 28 aminoácidos producido principalmente en el estómago que muestra una potente actividad liberadora de GH, mediada por la activación del receptor de secretagogos de GH (GHS-R). Además, la ghrelina, tiene otras muchas funciones entre las que destaca el control de la ingesta, actuando probablemente a nivel hipotalámico (neuronas AGRP, NPY), como señal orexigénica.

Con el objeto de obtener un modelo experimental sobre el cual evaluar los mecanismos moleculares responsables de la secreción de ghrelina, así como la regulación de la misma, se ha estudiado la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano

AGS. La validación de este modelo se realizó determinando la presencia de mRNA de ghrelina (RT-PCR), de preproghrelina (inmunoblot) y evaluando la secreción de ghrelina al medio de incubación (RIA).

De los estudios realizados en relación a los ligandos que regulan la secreción de ghrelina, cabe destacar la inhibición observada de la secreción de esta hormona por el ácido lisofosfatídico (LPA: 1-acil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfato) a una dosis saturante de 1 µg/ml y un máximo de inhibición a las 5 horas. Asimismo, se describió la presencia, en esta línea celular, del receptor de LPA tipo 2 (RT-PCR). Comprobada la activación de las MAPK por parte del LPA (20 min, 1 µg/ml), establecimos la relación causa-efecto entre dicha activación y la inhibición de secreción de ghrelina. Esta relación se estableció gracias a ensayos de secreción en presencia del inhibidor específico de la ruta de las MAPK. Del mismo modo, tratamos de caracterizar los mecanismos desencadenados por el LPA que llevan a la activación de las MAPK descartando la participación de la PI3K, PKA, PKC, AMPc y PDE. Dado que el receptor de LPA tipo 2 está acoplado a proteínas G, evaluamos la contribución de Gi, descartando su participación. Posteriores ensayos revelaron la transactivación del EGFR a través de la tirosina quinasa c-Src en este proceso de activación de las MAPK.

Resumiendo, el tratamiento de la línea celular AGS con LPA conlleva la activación del receptor LPA2 con posterior activación del EGFR a través de cSrc, lo que conduce a la activación de la cascada de las MAPK y a la inhibición de la secreción de ghrelina. Estos datos nos permiten especular sobre un posible papel fisiológico del LPA sobre la secreción de ghrelina. Dicho papel, sería consistente con la secreción de LPA por parte de los adipocitos que controlan la movilidad y proliferación de los preadipocitos a través de receptores de LPA. De esta forma la relación entre el LPA y la ghrelina podría participar en el desarrollo del tejido adiposo.

Este trabajo ha sido financiado por el FIS y el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Red de Grupos RGTO (G03/028), Red de Centros (C03/08).

74

NIVELES PLASMÁTICOS DE GHRELINA Y LEPTINA TRAS LA INGESTA ORAL O LA INFUSIÓN DE GLUCOSA INTRAPERITONEAL EN PACIENTES TRATADOS CON DIÁLISIS PERITONEAL

F. Cordido^{a,d}, A. Rodríguez-Carmona^b, R. García-Naveiro^b, M.L. Isidro^a, P. Villaverde^b, J. García-Buela^c y M. Pérez-Fontán^{b,d}

Introducción: La insuficiencia renal crónica (IRC) se asocia con un aumento de los niveles plasmáticos de leptina y ghrelina. La regulación de la secreción de estas hormonas, en este contexto, no es bien conocida.

Objetivo: Analizar los efectos agudos de la alimentación oral y la infusión intraperitoneal de dializado con glucosa al 3,86% en los niveles plasmáticos de leptina y ghrelina en sujetos con IRC en diálisis peritoneal (DP).

Pacientes y métodos: Estudiamos diez pacientes y ocho controles sanos. Se realizaron las siguientes pruebas: alimento estandarizado vía oral (400 mL de Isosource Energy, Novartis®, 159 Kcal/100 mL), DP con intercambio con dializado con glucosa al 3,86% (pacientes) y placebo vía oral (400 mL de agua). Se estudiaron los cambios agudos en los niveles plasmáticos de ghrelina, leptina, glucosa e insulina.

Resultados: En los pacientes los niveles de ghrelina total disminuyeron moderadamente tras el alimento oral y tras el intercambio de DP [nadires del 90,6% (rango 85,1-94,5%), y del 92,2% (rango 58,7-101,9%) de los niveles basales respectiva-

mente, $p < 0,05$]. La respuesta al alimento oral estaba marcadamente abolida, comparada con la respuesta de los controles sanos [73,8% (rango 56,1-89,1%), $p < 0,01$] ($p < 0,005$ vs pacientes). Los niveles plasmáticos de ghrelina acilada presentaron disminuciones menos marcadas, pero más persistentes, tras DP [nadir 80,4% (rango 55,1-96,3%), $p = 0,02$] que tras el alimento oral [64,4%, (rango 45,6-82,3%), $p = 0,005$]; de nuevo, las modificaciones fueron más importantes en los controles que en los pacientes [47,4% (rango 32,1-67,3%), $p = 0,012$] ($p < 0,05$ vs pacientes). Los niveles de leptina disminuyeron ligeramente ($p < 0,05$) tras el intercambio de DP en los pacientes, pero no se modificaron tras el alimento oral ni en los pacientes ni en los controles.

Conclusiones: La secreción de ghrelina es parcialmente resistente a los efectos inhibidores del alimento oral en los pacientes en DP. El intercambio peritoneal con glucosa hipertónica provoca una disminución significativa de los niveles plasmáticos de ghrelina. Los niveles plasmáticos de leptina no se modificaron tras el alimento oral ni en los pacientes con IRC ni en los controles sanos.

75

NIVELES PLASMÁTICOS POSTPRANDIALES DE GHRELINA TOTAL Y ACILADA EN SUJETOS NORMALES, TRAS UNA COMIDA MIXTA

P. Álvarez-Castro^a, M.L. Isidro^a, M. Pérez-Fontán^{b,d}, A. Rodríguez-Carmona^b, J. García-Buela^c y F. Cordido^{a,d}

^aServicios de Endocrinología, ^bNefrología y ^cANálisis, Hospital Juan Canalejo, La Coruña, y ^dDepartamento de Medicina, Universidad de La Coruña, La Coruña.

Introducción: La ghrelina es un péptido producido predominantemente por el estómago. Varios estudios sugieren que la ghrelina juega un papel importante en el control de la ingesta y el peso corporal. En lo que respecta a sus acciones endocrinas, la ghrelina necesita de la presencia de un grupo n-octanoyl en la posición Ser³ (ghrelina acilada). Los niveles circulantes de ghrelina aumentan antes de las comidas y disminuyen tras la ingesta de nutrientes. No está claro qué mecanismos son responsables de esta disminución postprandial de los niveles de ghrelina total y acilada.

Objetivo: Estudiar los mecanismos hormonales responsables de la respuesta postprandial de la ghrelina total y acilada, tras una ingesta mixta.

Pacientes y métodos: Estudiamos 8 sujetos sanos (4 varones), con una edad media de 53 años (rango 36-61), y media de índice de masa corporal (IMC) de 25,7 kg/m² (rango 20,1-29,3). Tras el ayuno nocturno cada sujeto se sometió a dos pruebas, en distintos días: alimento estandarizado vía oral (400 mL de Isosource Energy, Novartis®, 159 Kcal/100 mL) y placebo oral (400mL de agua). Se obtuvieron muestras de sangre en los tiempos 0, 30, 45, 60 y 120 minutos. Los niveles de ghrelina total y acilada se midieron por RIA. Las comparaciones intra-grupo se basaron en el test de Wilcoxon. Las correlaciones numéricas se analizaron usando el test de correlación de Spearman. $P \leq 0,05$ se consideraron significativas.

Resultados: La ghrelina total disminuyó a niveles del 73,8% (rango 56,1-89,1) de los niveles basales ($p < 0,01$). La ghrelina acilada disminuyó a niveles del 47,4% (rango 32,1, 67,3) de los niveles basales ($p < 0,05$). Ni el alimento oral ni el placebo modificaron los niveles plasmáticos de leptina. Como era previsible, los niveles plasmáticos de glucosa e insulina aumentaron tras el alimento oral. Los niveles plasmáticos de GH disminuyeron de modo significativo tanto tras el alimento oral como tras el placebo. Tras la comida mixta la resistencia insulínica, según el HOMA-IR, se relacionó significativamente con el área

bajo la curva (AUC) de la ghrelina acilada ($r = 0,690$, $p < 0,05$) y ghrelina total ($r = 0,783$, $p < 0,05$) expresada como porcentaje de la basal. AUC de la insulina tras el alimento mixto se correlacionó significativamente con la AUC ($r = -0,690$, $p < 0,05$) y el nadir de la ghrelina total ($r = -0,643$, $p < 0,05$).

Conclusiones: En los sujetos normales los niveles plasmáticos de ghrelina total y acilada disminuyen tras la ingesta de una comida mixta. La ghrelina total y acilada (expresada como porcentaje de los niveles basales) tras la comida se relacionan positivamente con la resistencia insulínica. Los niveles de ghrelina total tras la comida se relacionan negativamente con la insulinenia postprandial. Estos resultados sugieren que la resistencia insulínica basal disminuye la supresión postprandial de ghrelina total y acilada y que la insulina es un regulador importante de los niveles postprandiales de ghrelina total.

76

KISS-1 ACTIVA DE FORMA DIRECTA LAS GONADOTROPAS Y SOMATOTROPAS DE RATA Y ESTIMULA LA SECRECIÓN DE GH Y LH

E. Gutiérrez-Pascual, A.J. Martínez-Fuentes, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, M.M. Malagón y J.P. Castaño

Dpto. Biología Celular, Fisiología e Inmunología., Universidad de Córdoba, Córdoba.

KiSS-1 (kisspeptina-54 o metastina), es un péptido de 54 aminoácidos codificado por el gen *KiSS-1* que se caracterizó originalmente por su capacidad para inhibir metástasis tumoral a través del receptor acoplado a proteínas G, GPR54. Estudios más recientes han demostrado que la mutación del gen GPR54 provoca hipogonadismo hipogonadotrópico e infertilidad en humano y en ratón, desvelando así un papel clave de KiSS-1 y GPR54 en el control neuroendocrino del eje reproductor. De hecho, el tratamiento con KiSS-1 induce un notable aumento de la secreción de las dos gonadotropinas, LH y FSH, primariamente mediante una acción estimuladora de KiSS sobre la secreción de GnRH por el hipotálamo, donde se expresa GPR54. Por el contrario, aunque se ha descrito que la hipófisis expresa unos niveles elevados de GPR54, los estudios acerca de las acciones de KiSS-1 sobre esta glándula son contradictorios. Por tanto, hemos investigado la acción directa de KiSS-1 sobre las células hipofisarias de ratas prepúberes mediante una doble estrategia. En primer lugar, estudiamos la dinámica de calcio libre citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) en células individuales en cultivo en respuesta a kisspeptina-10 (10^{-6} M), un decápéptido que contiene la región bioactiva de KiSS-1, y realizamos una identificación inmunocitoquímica *post-facto* de las células estudiadas utilizando anti-LH y anti-GH, para determinar los tipos celulares hormonales sensibles a kisspeptina-10. Además, para establecer el posible efecto directo de kisspeptina-10 sobre la secreción hormonal, realizamos tratamientos con distintos tiempos de incubación y dosis de kisspeptina-10 sobre cultivos de células adenohipofisarias de rata y evaluamos la secreción de LH y GH por RIA. Los resultados de los ensayos de Ca^{2+} demuestran que kisspeptina-10 actúa directamente sobre las células adenohipofisarias de rata macho prepúber, induciendo aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$. La inmunocitoquímica *post-facto* demuestra que este péptido actúa fundamentalmente sobre los dos tipos celulares estudiados, ya que un porcentaje reducido pero significativo de las células que responden a kisspeptina-10 son gonadotropas (LH), mientras que una proporción superior de las células que respondieron al tratamiento son somatotropas (GH). Los resultados obtenidos sobre secreción indican que el tratamiento con kisspeptina-10 (30 min o 4 h) aumenta de forma significativa la liberación de LH y de GH, tanto en cultivos celulares procedentes de ratas macho como de hembras, si bien dichos efectos son más moderados

que los de los respectivos reguladores primarios, GnRH y GHRH. No obstante, es importante destacar que el nuestros datos indican que el propio KiSS-1 se expresa en estas células hipofisarias, lo que sugiere la posible existencia de un bucle autocrino que podría contribuir al mantenimiento de la actividad funcional de estos tipos celulares en condiciones fisiológicas. En definitiva, nuestros resultados demuestran, por vez primera, que kisspeptina-10 actúa de forma directa sobre las gonadotropas y las somatotropas de rata, induciendo en las mismas un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y estimulando la secreción de GH y LH.

Financiación: CVI-139 (J. And.); BFU2004-03883/BFI (MEC/FEDER), RCMN C03/08; PI042082 (Instituto de Salud Carlos III, MSyC)

77

PAPEL DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS TIROIDEAS EN LA PROLIFERACIÓN DE LA PIEL Y RECRECIMIENTO DEL PELO

L. García^a, M.A. Gómez-Ferrería^a, B. Vennstrom^b, J. Paramio^c y A. Aranda^a

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC), Madrid.

^bInstituto Karolinska, Suecia. ^cCIEMAT, Madrid.

Los receptores de hormonas tiroideas (TRs) están codificados por dos genes α y β que dan lugar a diferentes isoformas. Para analizar el papel de estos receptores en la piel hemos utilizado ratones dobles knock-out ($TR\alpha^{-/-}/TR\beta^{-/-}$) que carecen de ambos genes, que hemos comparado con ratones controles y ratones hipotiroideos. En condiciones normales no existen diferencias aparentes en la histología de la piel entre los diferentes grupos, aunque se detecta una disminución importante en la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) en los folículos pilosos tanto en los animales $TR\alpha^{-/-}/TR\beta^{-/-}$ como en los hipotiroideos, lo que sugiere que estos receptores pueden jugar un papel en el crecimiento del pelo. Para confirmar este hecho hemos comparado el crecimiento del pelo tras la depilación y tratamiento tópico con agentes como el éster de forbol TPA o el ácido retinoico (RA) en los ratones normales y knock-out, habiéndose observado un retraso muy significativo del crecimiento en los ratones que carecen de los receptores. El efecto de la ausencia de TRs sobre la piel no se limitó al crecimiento del pelo, sino que también influyó en otras estructuras produciéndose una fuerte alteración de la epidermis interfolicular en los animales $TR\alpha^{-/-}/TR\beta^{-/-}$ tratados con RA. Esta alteración condujo a la formación de heridas y venía acompañada de una reacción inflamatoria exagerada. En los animales normales el tratamiento durante 48 h con TPA produce hiperproliferación observándose que más del 30% de los queratinocitos de la capa basal incorporan BrdU lo que conduce a un aumento en el número de capas de queratinocitos en la epidermis. Tanto la deleción de los receptores como el hipotiroidismo causan una fuerte inhibición de la incorporación de BrdU y una disminución del grosor de la epidermis. La respuesta inflamatoria al TPA se encuentra también incrementada, principalmente en los animales hipotiroideos, existiendo un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6) y de un marcador de linfocitos T. En contraste con los acusados efectos del receptor y las hormonas tiroideas en la proliferación de la epidermis *in vivo*, los cultivos primarios de queratinocitos obtenidos de animales controles y $TR\alpha^{-/-}/TR\beta^{-/-}$ recién nacidos no nos mostraron diferencias en su tasa de proliferación, sugiriendo que los efectos más importantes de los TRs no se ejercen directamente en los queratinocitos, sino que son secundarios a alteraciones causadas en otro/s tipos celulares.

78

PAPEL DEL RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDEOS EN TUMOROGÉNESIS Y FORMACIÓN DE METÁSTASIS EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO

A. Martínez-Iglesias Olaia^a, S. García-Silva^a, J. Regadera^b
y A. Aranda^a

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC).

^bUniversidad Autónoma de Madrid

Los receptores de hormonas tiroideas (TRs) se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos pero, en general, células immortalizadas o transformadas expresan bajos niveles de TRs. Se ha descrito que la expresión de la isoforma b de este receptor se puede inactivar por metilación de su promotor en estados iniciales del cáncer de mama, y que el gen que lo codifica se encuentra mutado en muchos pacientes con esta patología. Para analizar el papel del TRb como supresor tumoral, se reexpresó este receptor mediante infección viral de forma estable en células de adenocarcinoma mamario MDA MB 468, que carecen de TRs. Cuando las células se inocularon ortotópicamente en la mama de ratas inmunosuprimidas, se observó que la presencia del TRb retarda la aparición del tumor y retrasa su crecimiento. Los tumores originados en la mama por las células MDA MB 468 parentales son muy agresivos, presentando un frente invasivo en trabéculas que ha invadido la musculatura de la cavidad abdominal de los animales. Por el contrario, no se observa esta invasividad en los animales inoculados con células que expresaban el receptor. El análisis de la expresión de distintos marcadores de la transición epitelio-mesénquima demostró un aumento en el grado de diferenciación en los tumores originados por células que expresaban TRb. Además, en ensayos *in vitro* en cámaras de migración, las células que expresan TRb mostraron también una fuerte inhibición de la capacidad invasiva a través de matriz. Desde un punto de vista molecular hemos comprobado que la re-expresión de TRb inhibe la respuesta proliferativa inducida por el tratamiento con la citoquina TGFb o por los factores de crecimiento EGF e IGF. Además hemos observado que la actividad de la metaloproteasa MMP9 se encuentra reducida en las células que expresan el receptor. Por RT-PCR cuantitativa hemos demostrado que la expresión de TRb disminuye los niveles de ARNm de CXCR4, receptor de la quimoquina CXCL12 que es responsable del reconocimiento de los órganos diana para la formación de metástasis. También se encuentran disminuidos los niveles de ARNm del receptor de membrana c-Met, receptor de la citoquina HGF, que es indicador de la capacidad invasiva y metastásica de la línea celular. Todos estos resultados muestran un claro papel del TRb como supresor tumoral y de la formación de metástasis en las células de cáncer de mama.

79

REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LH POR KISS-10 Y KISS-52 EN RATAS EN FREELY-MOVING

M.J. Vázquez^a, S. Tovar^a, V.M. Navarro^b, R. Fernández-Fernández^b, J.M. Castellano^b, E. Vigo^b, J. Roa^b, F.F. Casanueva^c, E. Aguilar^b, L. Pinilla^b, M. Tena-Sempere^b y C. Diéguez^a
^aDpto de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. ^bDpto de Biología Celular, Fisiología e Immunología. Facultad de Medicina Universidad de Córdoba. ^cDpto de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.

Introducción: El gen Kiss-1 da lugar mediante procesamiento proteolítico a una serie de péptidos denominados en su conjunto como kisspeptinas.

Las kisspeptinas se unen a GPR54, receptor asociado a proteína G, a través del cual ejercen un potente efecto secretor de LH, tal y como se ha observado en distintas especies.

Objetivo: Dado que, hasta el momento, el efecto sobre la administración de Kiss-1 había sido valorado sólo mediante administración icv, nos proponemos valorar el efecto del Kiss-1 sistémico sobre el eje gonadotrópico.

Materiales y métodos: Para ello usamos ratas macho Sprague-Dawley de 250-300 g, que son operadas para ponerle una cánula intrayugular, y que posteriormente se mantienen en jaulas individuales bajo condiciones constantes de luz y temperatura.

Se analizó la respuesta secretora de LH tras la administración intravenosa de Kiss-10, (Kiss-1(110-119)-amida de ratón) y Kiss-52 (Kiss-1(68-119)-amida de ratón) en diferentes estados experimentales. En los que se usa un protocolo de extracción seriada de sangre de las ratas en *freely moving*.

Posteriormente los niveles hormonales fueron analizados mediante RIA.

Resultados: La respuesta de LH a la administración periférica de Kisspeptina es extremadamente sensible. A dosis tan bajas como 0,1 µg provocaba un repentino pico secretor de LH, cuya magnitud era dosis dependiente llegando a una respuesta máxima similar en las dosis de 1 y 10 µg de Kiss-10. Incluso en estado de ayuno, cuando el eje gonadal está inhibido, la administración de Kiss-1 consigue revertir este efecto mediando un incremento en la secreción de LH.

Finalmente la inyección repetida de Kiss-10 (4 bolos a intervalos de 75 minutos) provocaba persistentemente un pico secretor de LH asociado, cuya magnitud permanecía constante a lo largo del período estudiado. Además, en este sentido, la respuesta de LH *in vivo* a una inyección terminal de GnRH se conservaba.

También se administró Kiss-52 iv pudiendo observar una potente secreción de LH tras la administración del péptido, lo que venía a demostrar que las distintas isoformas de Kisspeptinas presentan un efecto similar sobre el eje gonadotrópico.

Conclusión: En resumen, estos datos demuestran que el Kiss-10 y el Kiss-52 sistémicos ejercen un potente efecto secretor de LH en ratas macho, ya sea en dosis simples o repetidas.

Además, estos resultados pueden contribuir a sentar las bases para el uso terapéutico de análogos de Kisspeptinas en la manipulación farmacológica del eje gonadotrópico

80

REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN GÁSTRICA DE GHRELINA

O. Al-Massadi^a, L.M. Seoane^b, M.C. Carreira^a
y F.F. Casanueva^b

^aLab Endocrinología Molecular. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Santiago de Compostela. ^bComplejo Hopitalario Universitario de Santiago.

La ghrelina como su receptor, se expresan en diversos tejidos. La ghrelina incrementa la secreción de GH en rata y humano siendo también un potente regulador de la ingesta, su principal fuente de producción es el estómago. No existen evidencias del efecto que el ayuno ejerce sobre los niveles de secreción de la hormona directamente del tejido gástrico.

Objetivos: Poner a punto un mecanismo “*in vitro*” que nos permita estudiar la secreción de ghrelina directamente a partir de explantes tisulares.

Esclarecer como el ayuno y distintos estímulos afectan a la secreción de ghrelina por parte del tejido gástrico.

Estudiar el mecanismo que regula la secreción de ghrelina por parte del estómago.

Métodos: 1) Se midió la secreción de ghrelina a partir de explantes gástricos en ratas “ad libitum”, en diferentes períodos de ayuno, realimentación y alimentación fantasma modificada (consistente en ver y oler el alimento pero no masticarlo ni tragarlo). 2) Se incubaron los explantes de tejido, añadiendo al medio de cultivo distintos estímulos potencialmente reguladores de la secreción de ghrelina.

Conclusiones: El ayuno ejerce una estimulación de la secreción estomacal de ghrelina.

Los estímulos de los explantes de tejido gástrico como GH y SS modifican la secreción de ghrelina. Los explantes gástricos obtenidos de ratas sometidas a una realimentación de 15m y de ratas sometidas a una alimentación fantasma modificada producen una secreción de ghrelina significativamente menor con respecto al tejido de ratas en ayuno y similar a ratas control.

Por lo que sugerimos un papel de la estimulación cefálica vagal en el control de los cambios relacionados con la ingesta debidos a la ghrelina.

81

REGULACIÓN METABÓLICA Y HORMONAL DE LIPIN EN TEJIDO ADIPOSO DE RATA

C.R. González^a, J.E. Caminos^b, R. Nogueiras^a, M. J. Vázquez^a, S. Tovar^a, H. Mendieta^a, C. Diéguez^a

^aFac. Medicina, Dep. Fisiología Universidad de Santiago de Compostela. ^bFac. Medicina, Dep. Fisiología, Universidad Nacional de Colombia

La obesidad y la lipodistrofia son los dos extremos opuestos que resultan de la alteración de la expresión de los genes vinculados al desarrollo del tejido adiposo. Uno de ellos es *Lipin 1*, cuya deficiencia da lugar a una Lipodistrofia, mientras que la sobreexpresión de la proteína resultante, Lipin, da lugar a animales obesos. Se expresa fundamentalmente tejido adiposo, músculo esquelético y testículo, así como en 3T3-L1 preadipocitos.

En nuestro estudio hemos determinado la regulación en el tejido adiposo blanco de rata durante distintos estadios metabólicos, como son: Desarrollo postnatal, Ayuno, Gestación, Restricción en Vírgenes y Gestantes, camadas SL (nº de hermanos pequeño), NL (tamaño normal de camada) y LL (nº de hermanos muy alto), Suplemento de Adiponectina, ratas deficientes y ratas suplementadas con Leptina, deficiencia en Hormona de Crecimiento, tratados con TZD y Metformina.

Para este estudio, hemos utilizado ratas machos y hembras de la raza Sprague-Dawley, ratas deficientes en el receptor de leptina o Zucker y ratas deficientes en Hormona de Crecimiento (Dwarf). Para la detección del ARNm de ambos factores se utilizó la RT-PCR, mientras que para su cuantificación utilizamos la RT-PCR tiempo-real.

Los resultados obtenidos acerca de los niveles de ARN de Lipin, nos revelan que se encuentra regulada negativamente por la leptina, la adiponectina en ratas vírgenes y en ratas Zucker, y se produce un descenso progresivo en los niveles de expresión durante el desarrollo postnatal y un acusado descenso al final de la gestación en ratas (día 21). Por la contra los niveles de Lipin aumentan al administrarle tratamientos sensibilizadores de insulina. También existe un aumento en camadas LL respecto a SL a la edad de 90 días. Finalmente, ni el ayuno ni la restricción alimenticia causan alteración alguna.

82

UNIÓN DE CORREPRESORES AL HETERODÍMERO VDR/RXR EN RESPUESTA A VITAMINA D: UN NUEVO MODELO DE UNIÓN DE COREPRESORES A LOS RECEPTORES NUCLEARES

R. Sánchez-Martínez, A.I. Castillo y A. Aranda

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC). Madrid.

Las acciones de la 1,α,25-dihidroxivitamina D3 (Vitamina D) están mediadas a través su unión al receptor nuclear VDR. Este receptor se une al ADN generalmente en forma de heterodímero con el receptor X de rexinoides (RXR). Los receptores nucleares regulan la transcripción a través del reclutamiento de correpresores y coactivadores. En ausencia de ligando estos receptores unirían correpresores, lo que reprimiría la expresión génica. Tras la unión del ligando, los receptores sufrirían un cambio conformacional que permitiría la liberación de correpresores y el reclutamiento de coactivadores a través de la región AF-2 (función de activación transcripcional dependiente de ligando) localizada en el extremo C-terminal. Los coactivadores provocarían la activación transcripcional. Comparando con otros heterodímeros, potentes represores en ausencia de ligando, la capacidad represora del VDR/RXR traducida en reclutamiento de correpresores, nunca ha sido realmente demostrada.

Utilizando ensayos de retardo en gel y ensayos de “un híbrido” en células HEK-293 hemos observado que paradójicamente la Vitamina D produce un aumento del reclutamiento de correpresores al heterodímero, que aumenta potenteamente tras la delección del dominio AF2 del RXR, desenmascarándose la capacidad represora del VDR/RXR cuando se elimina dicha región. Existe una buena correlación entre la potencia agonista de diferentes análogos de la vitamina D y el reclutamiento de correpresores. Las mutaciones en los dominios de unión de correpresores en el RXR muestran efectos mucho más drásticos que las mutaciones en el VDR. Esto sugiere que la unión de un agonista al VDR produce un cambio conformacional en el RXR que desenmascararía la superficie de unión de correpresores de este receptor. La mutación de residuos en la región AF2 del VDR disminuye también el reclutamiento de correpresores en respuesta a Vitamina D, ejerciendo esta región del VDR algún tipo de control alostérico sobre el RXR en respuesta a la unión de un ligando agonista. Dado el mayor reclutamiento de correpresores, la sobreexpresión de RXR delecionado en AF2 produce una importante disminución de la respuesta a Vitamina D en ensayos de transfección transitoria. Estos resultados se confirman con el análisis de los niveles de RNA mensajero del gen cyp24. La capacidad transactivadora se restaura con las mutaciones en el RXR que abren la unión de correpresores.

En resumen, nuestros resultados indican que el dominio AF2 del RXR inhibe la unión de correpresores al heterodímero VDR/RXR y demuestran por primera vez el reclutamiento de correpresores por receptores nucleares en respuesta a un ligando agonista. Ya que los coactivadores y correpresores compiten por la unión al heterodímero, el contenido relativo entre ambos tipos de coreguladores podría modular de forma específica su capacidad transcripcional en diferentes tejidos diana de la vitamina D.