

**INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA DE FARMACIA**

**VISIÓN ENDOCRINA ACTUAL
DE LAS INTERCONEXIONES CELULARES:
LA FAMILIA DE LA INSULINA**

**Por la
EXCMA. SRA. D.^a ANA MARÍA PASCUAL-LEONE PASCUAL**

**DISCURSO LEÍDO EN LA SESIÓN DEL 13 DE DICIEMBRE DE 2001
PARA SU RECEPCIÓN COMO ACADÉMICO DE NÚMERO**

**CONTESTADO POR EL
EXCMO. SR. D. MANUEL RUIZ AMIL**



MADRID - 2001

Depósito legal: M. 49.640-2001

Impreso en Realigraf, S. A - Pedro Tezano. 26. 28039 Madrid

INTRODUCCIÓN

*Excmo. Sr. Director de la Real Academia de Farmacia,
Excmos. Señoras y Señores Académicos,
Señoras y Señores*

En primer lugar, quiero agradecer públicamente a esta digna Real Corporación el haberme aceptado como Académico de Número para ocupar la vacante correspondiente a la Medalla n.º 14. Mi reconocimiento es grande y sincero, ya que el haber sido, desde 1996, Académico Correspondiente y haber colaborado y asistido a sus Sesiones me han permitido conocer y valorar su labor, así como a todos sus miembros. Mi emoción es profunda porque en este mismo edificio estudiaron Farmacia mi madre y su padre, mi abuelo. Mi agradecimiento es, si cabe, más acentuado para los Profesores D. León Villanúa, D. Manuel Ruiz Amil y D. Antonio Martínez; que avalaron mi candidatura y me apoyaron en todo momento. El Dr. D. Manuel Ruiz Amil ha sido compañero en el Departamento de Bioquímica durante años, hemos coincidido allí, él como Director de Departamento y yo como Directora del Instituto de Bioquímica, Centro Mixto UCM-CSIC, ubicado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia. Por ello tuvimos que colaborar en su dirección y hemos llegado a conocernos y apreciarnos. Yo tengo amplio conocimiento de su gran formación científica y de sus cualidades humanas, por lo cual me honra enormemente que haya aceptado contestar a mi discurso.

Como expuse en mi entrada como Académico Correspondiente, he trabajado siempre en los factores ambientales, que son decisivos para el desarrollo biológico de los mamíferos, y esos mismos factores ambientales lo son, sin duda, para el desarrollo intelectual. Creo que mi hermano Juan, que es Catedrático en York University, en Toronto, y trabaja en el desarrollo de la inteligencia, estará de acuer-

do. Siempre he estado motivada por el conocimiento científico, pero he tenido mucha suerte con mis influencias ambientales, he vivido rodeada de personas que me han aportado mucho. Mis padres, médico y farmacéutica, que inculcaron en los cuatro hermanos el deseo de conocimiento y el amor al trabajo, por lo que los cuatro enfrentamos con seriedad nuestra tarea intelectual. Mis hermanos, que nacieron los tres juntos, y siempre me han amparado con su cariño. Mi marido, Catedrático de Filosofía, con cuyo apoyo incondicional e inteligencia siempre he contado, sin regatear esperas y soledades por mis largas permanencias en el laboratorio. También tuve suerte con mis maestros, desde Doña Consuelo Sempere, en Primaria; mis profesores en la Facultad de Farmacia de Barcelona hasta el Dr. García-Blanco, como Director de mi Tesis Doctoral en la Facultad de Medicina, en Valencia; el Dr. Jordano, en Córdoba; el Dr. Primo, en Valencia, o los Doctores Alfred Jost y Mme Daudel, en París, en mi formación postdoctoral. Igualmente debo mucho estímulo a todos los componentes de mi grupo de investigación: Fernando Escrivá, Carmen Álvarez, Luis Goya, Francisco Rivero, Sonia Ramos, y un largo etc. de mucha gente. También quiero agradecer la libertad de acción que me procuró D. Ángel Santos cuando me trasladé a Madrid en 1970 y comencé a formar mi grupo de investigación, y las colaboraciones continuadas con el grupo de los Dres. Escobar, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas del CSIC, y con el Dr. Portha, en París.

Es una obligación ineludible y grata hablar de mi antecesor en la Medalla n.º 14 de esta dignísima Corporación. En este caso se trata del Prof. D. Octavio Carpena Artés, con cuya ayuda y de cuya mano entré como Académico Correspondiente el 7 de noviembre de 1996, y, con dolorosa sorpresa por mi parte, murió el 6 de febrero de 1997 de una grave enfermedad, nunca comunicada, nunca dicha ni contada, probablemente para no herir, para no abrumar o entristecer a nadie. La primera vez que yo solicité mi admisión para esta misma vacante les dije a ustedes el mucho interés que tenía en sucederle por razones personales, basadas en mi agradecimiento a su figura. Por ello es para mí hoy un honor inmenso y, sin duda, inmerecido, dada la enorme labor que el Dr. Carpena realizó y de la cual hablaré a continuación.

El Dr. Carpena nació en 1920, concretamente el 21 de julio, en Santomera, localidad situada a 13 km. de Murcia. De alguna manera, es un mediterráneo que nació cerca de la huerta, como yo, que

nací en Valencia, y por ello me honro también. La localidad en que nació el Dr. Carpena ha adoptado actualmente como frase publicitaria «el limonar de Europa», frase adecuada para el lugar de nacimiento de un investigador tan implicado en los problemas del cultivo de los cítricos. La labor realizada por D. Octavio Carpena fue muy bien glosada en su faceta científica y académica por los Académicos de esta Corporación D. Segundo Jiménez y D. Gaspar González en la sesión necrológica celebrada en esta Real Academia el 29 de mayo de 1997. También habló en ella de su figura, como docente, uno de sus discípulos, el Prof. Andreu. Todos ellos fueron absolutamente objetivos en sus intervenciones, ya que partían, además, de un conocimiento directo de las facetas de D. Octavio de las que hablaban. De ninguna manera podría yo mejorar las glosas científicas y académicas que hicieron. Sin embargo, mi lectura de su discurso de entrada como Académico en esta Corporación, el 29 de abril de 1976, me ha permitido valorar la justeza de las palabras del Dr. Jiménez sobre su labor científica. Este discurso del Dr. Carpena tiene un gran rigor científico, en una temática difícil. Se titula «*Aspectos fisicoquímicos de la nutrición vegetal*». Pero, además, emana entusiasmo y profunda motivación. Su conocimiento del tema es muy extenso. A través de sus palabras se adivina también su personalidad, la capacidad de entrega a su trabajo y su bondad, que fueron glosadas por el Dr. González y el Dr. Andreu, como les he dicho. Los vegetales han sido siempre la base del mundo viviente; como diría mi marido, desde su perspectiva filosófica, los vegetales toman materia inanimada, minerales, y la elevan a materia orgánica, contrariamente a los animales, que vivimos a costa de otros seres vivos. No es mi tema, pero la nutrición vegetal, de la que nos habla el Dr. Carpena magistralmente, es fascinante. También he aprendido en su discurso que esta Medalla n.º 14 la ocupó antes D. José Ranedo, cuya figura conozco a través de mi madre y de mi amistad personal con María Luz Ranedo, con todo lo cual mi honor de ocuparla es infinito.

El 8 de mayo de 1998, el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), que fundó y dirigió el Dr. Carpena, le rindió otro homenaje póstumo en colaboración con el CSIC y promovido por la Presidencia de la Comunidad Autónoma de Murcia. Su lectura refleja muchas cosas. Además de ser el primer Catedrático de Química Agrícola de la Universidad española y de crear el Centro del Consejo antes mencionado, fue Director del Instituto de Asistencia Técnica del Sureste, Gerente para el Desarrollo Socio-

Económico de la Cuenca del Segura, Director de Investigaciones de la Asociación Nacional de Investigación de Conservas Vegetales, además de Presidente de la International Society of Citriculture, Secretario General del CSIC, cuando el Dr. Primo Yúfera, otro eminente investigador, fue Presidente del mismo, Emblema de Oro de la Hermandad Farmacéutica Murciana, Laurel de Murcia en Ciencias e Investigación y fue Comendador de la Orden Civil de Alfonso X el Sabio, entre otras distinciones. Pero lo que yo quisiera destacar aquí hoy es una faceta de su gran labor que frecuentemente se olvida en nuestro país... y volvemos a mi interés por los factores ambientales. Si se juzgara objetivamente los *curricula* científicos de los investigadores y profesores españoles actuales, habría que aplicar un factor corrector que es tanto más grande cuanto mayor tiempo se realizó la labor en circunstancias económicas muy malas y poco propicias a trabajos intelectuales, como fue la postguerra civil. El Dr. Carpena terminó la Licenciatura en Farmacia con Premio Extraordinario a los 23 años, en 1943, y en 1975, cuando se trasladó a la Universidad Autónoma de Madrid, ya había realizado un ingente trabajo. Por razones cronológicas, muchos de ustedes conocen muy bien de lo que hablo. Todo su trabajo fue realizado en circunstancias económicas muy restrictivas. Pertenece a una generación que sin duda sentó las bases, con su esfuerzo, del florecimiento cultural actual. Y dicho esfuerzo fue tanto más penoso cuanto antes se había nacido. Yo nací diez años después que él, y también, sin embargo, sé de lo que hablo. Tuvo que haber, cualquiera que fueran sus circunstancias, mucho tesón, mucho trabajo, inteligencia y buen hacer en D. Octavio Carpena para lograr sus frutos, y mucha generosidad en su entrega. En la glosa del Dr. Andreu de su figura como docente habló de la «*octavina*» que decían sus discípulos que irradiaba D. Octavio y les hacía trabajar, mezcla de tenacidad, generosidad y entusiasmo. Pues bien, yo también recibí dicha «*octavina*», directa y personalmente. Cuando me comunicaba su apoyo para solicitar Académico Correspondiente, yo percibía que en aquel momento él estaba enfermo, y le decía que lo dejara, que lo aplazara, que yo no tenía prisa, pero él con entusiasmo y mucha generosidad me respondía que no fuera modesta en exceso y seguía apoyando mi candidatura con ese sentido de entrega a algo que se empieza, desinteresadamente.

Creo que nuestro país, con su florecimiento actual, tendrá siempre una deuda con esas generaciones de intelectuales que, sin duda, elevaron el nivel cultural a donde está hoy. Todo ello es muy de

destacar en personas como el Dr. Carpena, que, además de sus muchas cualidades intelectuales, fue capaz de trabajar de manera muy dura, en circunstancias difíciles del país, para lograr algo en beneficio de todos. Sus hijos deben estar muy orgullosos de su brillante tarea.

Voy a exponer ahora una serie de reflexiones y conclusiones sobre los logros en endocrinología obtenidos durante el siglo XX, y cómo los cambios conceptuales a que se ha llegado podrían ser calificados, en léxico de Thomas S. Kuhn, como una verdadera «*revolución científica*». Al final hablaré, según mi criterio, de las perspectivas de investigación para el siglo XXI.

1. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

La endocrinología estudia las interconexiones celulares realizadas por agentes químicos. Indudablemente, su estudio surgió como una necesidad planteada en la clínica por las consecuencias encontradas en pacientes con privación o alteración de determinadas hormonas. Esta necesidad clínica ha forzado siempre a la investigación endocrina a buscar resultados con aplicación terapéutica lo más inmediata posible. Durante años, aproximadamente hasta 1955, generaciones de estudiantes han considerado que los sistemas de coordinación celular en los organismos superiores eran el sistema nervioso y el endocrino. Los fascinantes hallazgos en neurología, y la falta de reflexión sobre los resultados en investigación básica endocrina sobre animales, indujeron, en principio, a pensar en la independencia de ambos sistemas. Sin embargo, pronto se sospechó que existían conexiones entre sistema nervioso y endocrino.

La endocrinología, por estudiar interconexiones celulares, ha tenido siempre una visión dinámica de los organismos vivos y de cómo salvaguardar la homeostasis orgánica. Quiero decir que, desde un principio, se ha sabido que la privación hormonal o el exceso de hormonas tenía repercusiones graves y alteraba fuertemente los equilibrios normales del organismo. No obstante, ha sido muy recientemente cuando su investigación se ha beneficiado del gran desarrollo metodológico de la genética y biología molecular. Las glándulas endocrinas, sus secreciones, ocupan un lugar muy destacado en todas las funciones vitales, como la reproducción de la

especie y funciones conexas; conducta sexual, crecimiento y diferenciación celular. Podría decirse que las hormonas rigen el metabolismo, provocando la expresión y activación de enzimas y adaptando el organismo a los cambios ambientales. En su memorable discurso como Académico de Número de esta Real Corporación en 1992, titulado «Moléculas y Materia Viva», el Doctor Ruíz Amil señalaba como atributos de la materia viva la asimilación y la reproducción, y ambas cosas están absolutamente regidas por el sistema endocrino; se puede decir, pues, que la endocrinología estudia las correlaciones y regulaciones celulares del organismo vivo por sustancias químicas.

La investigación endocrinológica se ha desarrollado toda durante el siglo XX y ha avanzado lentamente. Por una parte, la necesidad clínica de resultados inmediatos aplicables a fines terapéuticos humanos dirigió la investigación a la obtención de extractos hormonales. Y esa imperiosidad de resultados impidió la reflexión reposada de determinados hallazgos de ciencia básica sobre animales que se comenzaban a realizar, aunque la visión clínica ha aportado siempre a esta ciencia la riqueza del reflejo en humano de determinados situaciones patológicas. Por otra parte, las hormonas viajan en el plasma en cantidades mínimas, y hasta entrados los años 60 no se pudieron dosificar por radioinmunoensayo. Hubo que esperar a que Berson y Rosalind Yalow, mientras estudiaban el mecanismo de resistencia a la insulina en ciertos diabéticos, descubrieran que algunos de estos enfermos poseían anticuerpos contra la insulina (1). Rosalind Yalow recibió el Premio Nobel por ello.

Durante algún tiempo, esta rama de la biología, de la fisiología, se centró, fundamentalmente, en el estudio de vertebrados superiores, del hombre, cuando, sin embargo, su verdadero avance conceptual se ha producido haciendo endocrinología comparada, es decir, por el estudio comparativo entre la comunicación intercelular que se produce en animales inferiores y la que ocurre en animales superiores. Los grandes hallazgos de la endocrinología se realizaron ya muy avanzado el siglo XX. Starling (1902-1905) (2) fue quien comenzó a utilizar el término «hormona», que procede del griego «*hormon*» (lo que excita), y, a pesar de que hay hormonas que inhiben, el término se difundió rápidamente. El vocablo «endocrinología» viene del griego «*endon*» (dentro) y «*krinein*» (separar, desunir) y se introdujo pocos años más tarde que el de hormona.

Por todo ello, a principios del siglo XXI, cabe reflexionar sobre los planteamientos de la endocrinología y sus hallazgos y tratar de abrir perspectivas futuras. A lo largo de esta disertación intentaré dar una idea somera de los planteamientos conceptuales seguidos en el descubrimiento cronológico de neuropéptidos, factores de crecimiento y citoquinas, y de los resultados obtenidos, que nos están llevando a concepciones unitarias de los sistemas de correlación celular. Como veremos, nos están conduciendo al conocimiento de la interconexión profunda que existe entre los tres sistemas de conexión celular de los organismos superiores, sistema nervioso, endocrino e inmune.

Hoy más que nunca, parece vigente la concepción del Sistema Neuroendocrino Difuso o «APUD» células de Pearse (1969), del cual hablaré al final de la exposición. Los hallazgos de la endocrinología actual, en este comienzo del siglo XXI, nos llevan a una visión sumamente globalizante de las interconexiones celulares, lo cual, sin duda, va a marcar los derroteros de la investigación futura, y evidencia la gran necesidad de ella.

La familia de la insulina, que comprende además de dicha hormona los factores de crecimiento similares a la insulina, los IGFs (*insulin-growth factors*), sus proteínas transportadoras o ligadoras, así como sus receptores, es un buen ejemplo de esta visión unitaria de intercomunicación celular, ya que éstas sustancias tienen multifunciones en prácticamente todos los tejidos y están enormemente implicadas y reguladas por el metabolismo.

Parece conveniente recordar ahora la Regla VII de Descartes:

«Para hacer ciencia es preciso pasar revista en su totalidad y una por una, en un movimiento continuo y absoluto, ininterrumpido del pensamiento, a todas las cosas que conciernen nuestro propósito, y abrazarlas en una enumeración suficiente y ordenada».

DESCARTES, *Regla VII, Reglas para la Dirección del Ingenio*, 1628.

2. DESARROLLO CRONOLÓGICO DE LA ENDOCRINOLOGÍA

2.1. **Primeros descubrimientos: extracción y caracterización de hormonas**

En los comienzos del siglo XX, las teorías de Darwin y las leyes sobre la herencia de Mendel tuvieron un gran impacto sobre el pensamiento científico. Los investigadores comenzaron a pensar que, probablemente, todos los seres vivientes se regían por las mismas leyes, y que, fundamentalmente, quizá su organización celular variaba poco en las distintas especies. Debido a esto, desde 1900, los estudios de endocrinología comparada comenzaron a hacerse sistemáticamente. No podemos describir toda la ingente cantidad de pequeños descubrimientos endocrinos hechos en las distintas especies animales. Ya en 1849 A. A. Berthold, un profesor de Göttingen, había castrado pájaros y gallos a los que luego implantó testículos en la cavidad abdominal, observando que exhibían comportamiento normal de machos. De ahí dedujo que los testículos secretaban una sustancia que viajaba por la sangre y ejercía acciones que motivaban conducta de macho normal (3). Sin embargo, fue en 1889 cuando Brown-Sequard, un médico francés de 72 años, se inyectó un extracto acuoso de testículos de perro y publicó que ello le había producido un espectacular rejuvenecimiento. Dicho experimento lo expuso en París en la «Société de Biologie» y tuvo un gran renombre, a pesar de que dichos resultados son dudosos de creer dada la poca concentración de testosterona que tendría el extracto acuoso (4). Pero muchos han considerado dicho episodio como el nacimiento de la endocrinología, quizá, además, este resultado fue el comienzo de la leyenda sobre el rejuvenecimiento por hormonas y el comienzo de la apetencia de la gente por lograrlo a cualquier precio. No obstante, la primera hormona cristalizada fue la adrenalina o epinefrina, en 1901, por Takamine y Aldrich, independientemente, y ello fue el principio de la endocrinología bioquímica. Sin embargo, hay autores que creen que el comienzo de la respetabilidad de la endocrinología como ciencia y de su dimensión bioquímica (5) debe situarse en 1921, cuando Banting y Best aislaron la insulina del páncreas. Si se quiere hacer una enumeración cronológica de los primeros descubrimientos endocrinos más relevantes habría que transcribir la de J. D. Wilson del año 2000 (6).

TABLA 1. *Lista cronológica de algunos primeros descubrimientos endocrinos clave*

1889:	Brown-Sequard se inyecta extractos testiculares.
1891:	Murray trata bocios con extractos tiroideos.
1894:	Oliver y Schaefer demuestran la existencia de una sustancia vasopresora en la adrenal.
1897:	Abel cristaliza la adrenalina.
1903:	Bayliss y Starling descubren la secretina.
1912:	Se caracteriza la vasopresina en extractos de la pituitaria posterior.
1914:	Kendall cristaliza la tiroxina.
1921:	Evans y Long describen la hormona de crecimiento.
1922:	Banting y Best proveen insulina para el tratamiento de la Diabetes Mellitus.

La comparación de resultados en distintas especies dio, sin duda, pautas e ideas globales en endocrinología. Seguramente, fue Kopéc (1917-1922) el que comprendió por primera vez que las hormonas son de fundamental importancia en los invertebrados. El hecho de que la pupación en los lepidópteros es inducida por un factor que viene de su cerebro, pronto se comprobó en otro orden de insectos. Entre éstos, como entre los crustáceos, la intercomunicación celular se produce por secreciones, neurohormonas, en centros neurosecretores, que actúan directamente sobre tejidos diana o indirectamente en glándulas endocrinas. Sin embargo, estos estudios de endocrinología comparada fueron muchas veces olvidados por la endocrinología clínica. Durante años, los focos de interés en este campo fueron la identificación y purificación de hormonas, caracterización de los procesos que regulan y definición de sus efectos por exceso o defecto. Todo ello con la concepción establecida de que existían dos sis-

temas de coordinación celular independientes: el sistema nervioso y el endocrino, aunque había multitud de fenómenos y problemas endocrinos que no se explicaban con esta concepción de la separación entre ambos sistemas. La práctica clínica mostraba cantidad de causas emocionales que provocaban alteraciones endocrinas en los humanos. En animales se describieron observaciones interesantes en el axis gonadal, por ejemplo, que un ratón hembra preñado es capaz de interrumpir su gestación si se introduce en su jaula un ratón macho de especie diferente, pero no si se introduce otra hembra o un macho de igual especie; las sensaciones recogidas por los bulbos olfatorios producían modificaciones secretoras en el hipotálamo que aumentaban las gonadotropinas hipofisarias y se producía la menstruación. La coneja ovula por estímulos sensoriales producidos por el coito, y en la oveja se altera la conducta sexual modificando los fotoperíodos de modo artificial. Tampoco en clínica humana se explicaban multitud de alteraciones con esa separación entre sistema nervioso y endocrino.

2.2. Sistema neuroendocrino

Como se sabe, en los mamíferos la hipófisis es una glándula pequeña alojada en la silla turca, en el hueso esfenoides y constituida por dos lóbulos, el anterior o adenohipófisis y el posterior o neurohipófisis. Entre estas dos partes está la «pars intermedia» que en adulto no es muy secretora. Pronto se conoció el origen ectodérmico de la neurohipófisis, como de todo el sistema nervioso. Sus secreciones son los nonapéptidos vasopresina y oxitocina, que tienen aminoácidos comunes entre ellos y que parecen provenir de la arginina-vasotocina, que es la hormona única en los anfibios y que tiene en éstos propiedades similares a las dos hormonas humanas. Se cree que cuando los animales salieron del agua crearon una sola hormona capaz de mantener el equilibrio hídrico en los anfibios, y después se ha dividido en dos.

La vasopresina u hormona antidiurética fue sintetizada por Du Vigneaud (7) en 1952, pero fue Palay (8), en 1968, el que estableció claramente que el cuerpo de las células nerviosas que segregaban vasopresina y oxitocina estaba en los núcleos magnocelulares del hipotálamo, y que la neurohipófisis actúa de reservorio. Junto con la vasopresina y la oxitocina se segregan sus proteínas transportadoras, las neurofisinas.

Como es sabido, la adenohipófisis secreta seis hormonas: la de crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la hormona luteotropa (LH), la hormona estimuladora del folículo (FSH) —estas dos últimas son las dos gonadotropas del axis gonadal—, la tirotrópica (TSH) u hormona trófica del tiroides, y, por último, la corticotropa (ACTH). Para explicar todos los fenómenos emocionales y sensoriales que antes relatamos y que repercuten en alteraciones del axis gonadal, tiroideo o córticosuprarrenal, había que buscar un nexo de unión entre el sistema nervioso central y la adenohipófisis. Por similitud con los descubrimientos de Palay en la neurohipófisis, se buscaron durante años plexos nerviosos que unieran el hipotálamo y la hipófisis anterior, pero nunca se encontraron. Sin embargo, haciendo cortes seriados, Green y Harris encontraron en 1947 (9) una unión de vasos porta entre el hipotálamo y la adenohipófisis; Harris postuló en 1945 (10) que los estímulos hipotalámicos se darían, probablemente, en forma de neurosecreciones que bajarían por la vena porta a la adenohipófisis. Pero hubo que esperar a 1966 para que Schally (11), partiendo de cerebros de cerdo, y Guillemin de cerebros de oveja (12), aislaran en sus laboratorios el primer péptido hipotalámico que tenía propiedades hipofisotropas para el TSH —la tirotrópica o péptido hipofisario estimulador del axis tiroideo— le llamaron TRF (siglas de «tirotropin-releasing-factor»); resultó ser el l-piroglutamil-l-histidil-l-prolin-amida. Posteriormente, por ensayos *in vivo* e *in vitro*, se vio que esta estructura provocaba efectivamente la secreción de TSH. Ambos investigadores recibieron el Premio Nobel por ello. Su síntesis se logró en 1969. En 1971 Schally aisló y determinó la estructura del LRH, péptido hipotalámico estimulador del axis gonadal; es un decapeptido. Brazeau, del grupo de Guillemin (13), aisló, en 1973, el péptido hipotalámico inhibidor de la hormona de crecimiento; le llamó somatostatina (GIF-growth-inhibiting-factor-). En 1955, con el descubrimiento de Geoffrey Harris de que la vena porta une el hipotálamo y la pituitaria, comenzaron unas investigaciones que culminaron en 1966, con la extracción de dichos factores hipotalámicos. Posteriormente, se han sintetizado agonistas y antagonistas de ellos. Así se estableció que era el hipotálamo, el cerebro, el que regía, estimulando a la hipófisis, los axis endocrinos gonadal, corticotropo y tiroideo. Con ello se había mostrado la existencia de un sistema neuroendocrino en cuanto a la adenohipófisis, quedaba por mostrar si el sistema nervioso regía o no el páncreas y las hormonas gastrointestinales, ya que la médula adrenal es de origen ectodérmico, como el sistema nervioso.

2.2.1. *Neuropéptidos*

«Las crisis científicas debilitan los estereotipos y simultáneamente proporcionan los datos adicionales necesarios para un cambio de paradigma fundamental. La transición consiguiente a un nuevo paradigma es la revolución científica».

THOMAS S. KUHN, *La estructura de las revoluciones científicas*, 1962.

Paralelamente a las investigaciones anteriores se fueron describiendo en animales hechos importantes. En 1919, Speidel (14) describía en el cordón caudal de la espina dorsal de un pez, la raya, células glandulares de secreción interna. Kopéc (15), 1917-1922, describió en un lepidóptero «*Lymantria*» que la pupación era controlada por una hormona cerebral, como ya se ha indicado, y mucho más tarde, en 1931, se extrajo en mamíferos una proteína, la Sustancia P, que se encontraba en el intestino y también en el tejido nervioso (16). Todos estos hechos señalaban que, en toda la escala animal, las células del tejido nervioso, e incluso de otros tejidos, estaban secretando neuropéptidos. En 1928, Ernst Scharrer (17) expuso su descubrimiento de células nerviosas que actuaban como glándulas en el hipotálamo de un pez teleosteo «*Proximus laevis*». Y todos estos descubrimientos en animales fueron anteriores al conocimiento de que el lóbulo posterior de la hipófisis humana, la neurohipófisis, almacenaba vasopresina y oxitocina que eran elaboradas por células magnocelulares de los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo en los mamíferos superiores (18).

El matrimonio Berta y Ernst Scharrer, trabajando ella en invertebrados y él en animales vertebrados, establecieron, a partir de los años 40, la noción de neurosecreción (19.20).

La teoría de la transmisión de impulsos por las neuronas propuesta por Loewy y otros desde 1921, había asentado el concepto de que las señales neurológicas se transmitían siempre por procesos electrofisiológicos. Con este planteamiento, a las neuronas del hipotálamo que secretaban péptidos se las consideró una excepción y se las llamó neuronas neurosecretoras. Fue E. Scharrer el primero en proponer que el papel de estas neuronas era endocrino. Dijo que estas neuronas parecían tener un papel doble, neuronal y glandular,

y que por su carácter glandular enviaban directrices al sistema endocrino en su propio lenguaje químico; enviando secreciones que tenían la misma naturaleza y estructura de las secretadas en el sistema endocrino. Este tipo de secreción que las neuronas son capaces de producir es distinto de los neurohumores —neurotransmisores— que las mismas neuronas secretan en la sinapsis. Esas otras secreciones, iguales a las del sistema endocrino, viajan por la sangre a grandes distancias a diferencia de lo que hacen los neurotransmisores. Scharrer las llamó neurohormonas.

Durante el espacio de 50 años, a partir de 1930, hemos asistido al descubrimiento de una cantidad enorme de neuropéptidos (21). Hoy sabemos que la secreción parece ser una propiedad inherente a la neurona y que las vesículas de neurotransmisores se encuentran en las neuronas y se cotransmiten junto con los gránulos de neuropéptidos, que se secretan por despolarización de la membrana del axon terminal, con intervención, además, del catión cálcico y de proteína-quinasa específicas; de la misma forma que ocurre con la acetilcolina y los neurotransmisores clásicos. Los estudios morfológicos con el microscopio electrónico han hecho posible una precisa caracterización de los sitios de síntesis y secreción de los neuropéptidos. Se ha visto cómo se empaquetan en gránulos en el aparato de Golgi y cómo las neuronas tienen todas las características de células secretoras. Los péptidos se secretan desde los axones de la neurona por exocitosis como ocurre en las células glandulares. El microscopio electrónico y los procedimientos inmunocitoquímicos han permitido establecer no sólo la distribución, sino también la naturaleza química de estas secreciones. Asimismo se han encontrado exactamente los mismos neuropéptidos y con idéntica estructura en el intestino y en el cerebro, como ocurre con el somatostatín, Sustancia P y tantos otros. Un nuevo método de tinción desarrollado por Gomori para las células β del páncreas, la floxin-hematomaxilina-cromo-aluminio, ha hecho posible la visualización de estos productos peptídicos a través de toda la neurona. En la actualidad, se ha encontrado un enorme número de neuropéptidos cerebrales, no sólo en núcleos hipotalámicos sino en zonas fuera del hipotálamo, prácticamente en todo el sistema nervioso central. Todo esto ha producido una verdadera revolución científica en el orden conceptual, que llevó a Pearse (22) a concebir y establecer, en 1969, la idea de un sistema neuroendocrino difuso, del cual hablaré.

En cuanto a las funciones de estos neuropéptidos, parecen, entre otras cosas, modular los neurotransmisores de una manera aún no

conocida. La vasopresina, la hormona antidiurética, parece implicada también en la modulación de la secreción de factores hipofisotropos, como el CRF (hormona hipotalámica estimuladora del axis cortical), y además en comportamientos intelectuales como la memoria o el aprendizaje. Estos neuropéptidos activan o deprimen sinapsis cerebrales (20). Actualmente, se conoce mucho acerca de los procesos biosintéticos o de la estructura química de algunos de ellos por el uso de estrategias de genética molecular. Sabemos que todos estos péptidos bioactivos en el sistema nervioso o en las glándulas endocrinas son siempre derivados de una gran molécula precursora. Esta gran molécula es inactiva, la pro-proteína (o pre-pro-proteína) es sintetizada por expresión de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) en ribosomas del retículo endoplásmico del cuerpo de la neurona. Ejemplos de ello son la pro-opiomelanocortina que contiene aminoácidos de ACTH, α -MSH, β -endorfinas y β -lipotropinas o la pro-pesoquina de la cual derivan la vasopresina, la oxitocina y sus proteínas transportadoras, las neurofisinas.

Pruebas inmunocitoquímicas, así como de radioinmunoensayo, y pruebas inmunobiológicas, han establecido que los neuropéptidos están ampliamente distribuidos en el reino animal, desde los animales inferiores al hombre. El poseer actualmente antisueros contra los neuropéptidos de mamíferos superiores ha permitido la identificación de péptidos idénticos en los animales inferiores. Se piensa incluso que muchos de los neuropéptidos identificados en animales superiores puedan ser no funcionales y haber quedado como restos de un proceso evolutivo. Todo ello supone una ruptura con antiguos conceptos. Actualmente, se ha establecido: a) que se encuentran péptidos en vertebrados, en el sistema nervioso central, que antes se creía eran secretados solamente por células glandulares b) que péptidos que parecían pertenecer tan sólo a vertebrados se encuentran en animales invertebrados. Se cree que en animales inferiores, e incluso en plantas, existen péptidos hormonales y moléculas de tipo neurotransmisor que son los encargados de las interconexiones celulares. Tan sólo en animales invertebrados multicelulares surge el sistema nervioso y se diferencian las neuronas con sus caracteres neurosecretores, y solamente en los vertebrados se diferencian las glándulas periféricas endocrinas (Tabla 2). Estos hechos suponen una concepción unitaria de los mensajeros químicos que, a través de la evolución de las especies, interconectan las células de la materia viva (23). Ello rompe totalmente con la concepción de un sistema nervioso y otro endocrino como sistemas separados de interconexión

celular. Para llegar a este planteamiento ha habido que cambiar concepciones anteriores muy arraigadas, lo cual es difícil para la mente humana.

Tabla 2. *Evolución de las interconexiones celulares químicas a través de los organismos vivos*

PLANTAS SUPERIORES	OTROS ORGANISMOS UNICELULARES	INVERTEBRADOS UNICELULARES, PROTOZOOS	INVERTEBRADOS MULTICELULARES	VERTEBRADOS
				GLÁNDULAS ENDOCRINAS
			NEURONAS	
PEPTIDOS HORMONALES (NEURO PEPTIDOS)				
NEUROTRANSMISORES				

Extractado ref. 21 Doroty Krieger 1984.

2.3. **Coordinación endocrina del crecimiento y desarrollo celular. Factores de crecimiento.**

Una de las funciones primordiales a regular por la materia viva es la proliferación celular. Ello es necesario para la reposición de los tejidos, no sólo en etapas de crecimiento de los seres vivos sino también durante toda la vida adulta. La estandarización de técnicas de cultivos celulares, así como la posibilidad de cultivo de líneas celulares procedente de tumores, ha hecho posible la extracción desde los cultivos celulares, o muchas veces del suero sanguíneo fetal que se añade a estos cultivos, de unos polipéptidos con propie-

dades mitogénicas a los que se les puso el nombre genérico de factores de crecimiento (24) (25) y cuya estructura se ha establecido en muchos casos. En la tabla 3, extractada de un trabajo de 1984 (24), se muestran los más representativos ya entonces, pero además de incluir en la lista sustancias hormonales que regulan el crecimiento (24), se incluye también la interleuquina, hoy considerada una citoquina muy característica, como señalaremos a continuación. En los últimos años se ha ampliado la caracterización de un mayor número de ellos, de sus genes y sus receptores. Todos son estructuralmente polipéptidos, y la iniciación de sus respuestas comienza en la superficie celular formando un complejo con su receptor específico que se internaliza por endocitosis. El receptor tiene siempre actividad intrínseca tirosin-quinasa y produce respuestas hipertroóficas o hiperplásicas en las células; es decir, aumenta el número o el tamaño celular.

Al crecimiento celular contribuye una compleja variedad de factores hormonales, neuronales, interactuando con sustancias extracelulares. Las células pueden clasificarse en células postmitóticas, que están en estado de reposo y no pueden dividirse, otras que pueden estar reposando pero pueden dividirse en determinadas circunstancias, y otras que están continuamente dividiéndose. El estudio de los factores que regulan el crecimiento celular ha adquirido mucho relieve por su implicación en procesos neoplásicos. Es de destacar que en el año 1984 (Tabla 3) se enumeran los factores de crecimiento que habían sido ya totalmente identificados y algunos que lo han sido más tarde, pero se incluyen además citoquinas, entonces no claramente conocidas como tales, y también hormonas clásicas que parecían poder actuar como factores de crecimiento en determinadas circunstancias. Como veremos a lo largo de la exposición, efectivamente, entre estas hormonas es un ejemplo característico la insulina.

Células normales activadas por factores de crecimiento tienen la misma apariencia fenotípica que células neoplásicas transformadas por retrovirus, y en ambos casos parece producirse la misma cascada de señales en su proceso proliferativo. Es decir, mecanismos similares se disparan en transformaciones neoplásicas y cuando un factor de crecimiento inicia en células normales un proceso proliferativo. El factor de crecimiento extraído de plaquetas (PDGF) se identifica con el producto del gen transformante (oncogen) del sarcoma vírico del simio, proteína p28^{v-sis}. Los oncogenes V-erb-B

TABLA 3. *Principales factores de crecimiento y sustancias relacionadas*

Primeros caracterizados

Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
Factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I y II)
Interleuquina -2 (IL-2)
Factor de crecimiento nervioso (NGF)
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)
Factor de crecimiento transformante (TGF) (Tipo I o α)

Secundariamente encontrados

Factor derivado del cartilago
Factor estimulante de colonias (CSFs)
Factores de crecimiento de células endoteliales (ECGFs)
Eritropoyetina
Factor de crecimiento derivado del ojo (EDGF)
Factores de crecimiento fibroblasto (FGFs)
Factor de crecimiento glial (GCF)
Factor de crecimiento derivado del osteosarcoma (ODGF)
Timosina
Factor transformante (TGF tipo II o β)
Factor transformante (TGF γ)

Menos caracterizados

Factor de crecimiento derivado del hueso
Factor de crecimiento condrocito
Factor de crecimiento derivado del endotelio
Factor de crecimiento derivado de macrófagos

Sustancias que regulan el crecimiento

Hormona de crecimiento (GH)
Insulina
Lactógeno placentario
Prolactina
Relaxina
Trombina
Transferina
Vasopresina

Extractado de James R. and Bradshaw R.1984, ref (24)

y v-fms expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del factor de crecimiento estimulador de colonias 1 (CSF-1) respectivamente. La observación de cómo actúan los factores de crecimiento ha contribuido enormemente a la comprensión del papel que juegan dichos factores en actividades celulares normales y anormales y, por tanto, al entendimiento de las transformaciones neoplásicas celulares. También existen factores de crecimiento inhibidores de la proliferación celular como el TGF β . Podríamos decir que la proliferación de células en cultivo está bajo el control de factores de crecimiento. En ausencia de dichos mitógenos apropiados, las células dejan el ciclo celular y se paran en fase G_1/G_0 . Sin embargo, las células transformadas han dejado el control del ciclo celular, por ello pueden realizar dicho ciclo en la ausencia de los correspondientes factores de crecimiento. Se diría que la pérdida de los requerimientos del factor de crecimiento para su proliferación es un hecho significativo de las células transformadas y, además, ello contribuye grandemente a su defectuoso control proliferativo (26).

Casi todos los factores de crecimiento fueron en principio extraídos de medios de cultivo suplementados con suero fetal, y otros lo fueron en cultivos de fibroblasto de embrión de pollo. Todos proceden de una pro-proteína que luego se divide, por ello las familias en que se agrupan suelen provenir estructuralmente de una gran molécula proteica común. De muchos de ellos, se conoce la estructura del gen que los produce, su ADNc (ácido desoxiribonucleico complementario) y la secuencia completa de sus aminoácidos gracias a técnicas de ADN recombinante y de los estudios realizados con técnicas de genética y biología molecular. Se sabe que los factores de crecimiento son sintetizados por células normales y también por células transformadas neoplásicas. En principio, se pensó que la diferencia fundamental entre factores de crecimiento y hormonas era que los primeros actuaban en células vecinas de forma paracrina o en la misma célula que los producía de manera autocrina y, por tanto, no viajaban por la sangre para efectuar su acción en lugares apartados, como ocurre con las hormonas clásicas. Pero hoy se conoce que muchos de ellos, viajan por la sangre, así que las fronteras entre hormonas clásicas y factores de crecimiento, en cuanto a sus funciones, se van difuminando paulatinamente.

Todos los receptores de factores de crecimiento parecen tener actividad tirosin-quinasa intrínseca, como se ha dicho, y así sucede

también con el receptor de la insulina. Estos receptores, cuando son activados por su ligando, fosforilan substratos proteicos y muchos de ellos son fosforilados también en células transformadas por la acción de virus (27). Pero de estos receptores hablaré al tratar de factores de crecimiento similares a la insulina. La acción de estos receptores no se transmite, pues, por nucleótidos adenilicos, como sucede con determinadas hormonas.

2.3.1. *El feto como modelo «in vivo» de proliferación celular*

El feto es un organismo que tiene solventados su alimentación, su respiración, su excreción y su termogénesis por su madre, su único fin es crecer y desarrollarse. Es sin ninguna duda el modelo *in vivo* más importante de proliferación celular acelerada

La endocrinología fetal comenzó con los experimentos de Jost (28) y Moore (29) hacia 1947. Estos investigadores decapitaron fetos de rata *in utero* o dieron inyecciones de hormonas a la madre y al feto, tratando de establecer el estado funcional de las glándulas endocrinas fetales. Actualmente, los estudios se realizan sobre cultivos de tejidos fetales o bien se implantan catéteres a madre y feto *in utero*, procurando producir el mínimo de estrés. En estos experimentos se emplean fetos muy grandes, como el de la oveja, pero la población de animales cateterizados es siempre pequeña, debido a dificultades metodológicas de supervivencia y al coste de estos experimentos. En la oveja, el cateterismo se puede comenzar a los sesenta y seis días, no antes —gestación de esta especie 147 días— para tener cierta garantía de supervivencia. Sin embargo, la mayor parte de experimentos se ha realizado en la última parte de la gestación. Por estos procedimientos, se han podido establecer *in vivo*, y en situación bastante fisiológica, la evolución de las secreciones fetales de hormonas hipofisarias y también el control que ejercen sobre ellas las sustancias activadoras o inhibitoras —neurotransmisores u hormonas hipotalámicas—, ya que han podido ser inyectadas por estos catéteres. Este modelo de experimentación ha resultado muy útil para el conocimiento de la endocrinología fetal porque refleja más la situación real del funcionamiento del sistema endocrino del feto que cualquier determinación hormonal realizada sobre fetos provenientes de abortos humanos. No obstante, las extrapolaciones a humano procedentes de la experimentación animal presentan también dificultades, porque existen diferencias de

especie, por un mayor o menor período gestante y por otras peculiaridades. Entre ellas, la existencia en los mamíferos del llamado «período crítico de desarrollo cerebral» que determina un mayor o menor grado de madurez del sistema nervioso central, para una determinada etapa fetal. Por ejemplo, cronológicamente hablando, la rata nace con un sistema nervioso central que corresponde, aproximadamente, al quinto mes de gestación humana, mientras que la oveja nace mucho más madura que el hombre. Por ello, en el estudio de las regulaciones neuroendocrinas de feto humano, han sido muy útiles los estudios realizados sobre fetos anencefálicos humanos. Estos fetos tienen una pequeña, pero intacta, adenohipófisis, ahora bien, carecen totalmente de tejido hipotalámico o solamente poseen un diéncéfalo hipoplásico residual. Así, ofrecen una situación muy interesante para estudiar el control neuroendocrino en etapa fetal.

Todo el sistema endocrino fetal está adaptado y especializado para regular el enorme crecimiento que debe tener lugar, y por tanto la gran proliferación celular que se produce en etapa fetal (30). El sistema endocrino del feto tiene características propias, distintas del adulto y todas destinadas a regular su crecimiento. Por ejemplo, existen en este sistema una serie de ganglios cromafin-paraaórticos, que segregan norepinefrina, y la «*pars intermedia*» de la hipófisis es sumamente secretora, y ambas cosas, ganglios paraaórticos y abundantes secreciones en la hipófisis intermedia, desaparecen totalmente en la etapa adulta. Las estructuras y secreciones de la «*pars intermedia*» hipofisaria tienen una gran similitud con las encontradas en animales inferiores. Como se ha dicho reiteradamente, la ontogenia parece ser una recapitulación de la filogenia. Existen secreciones en el feto de mamífero similares a las encontradas en animales inferiores, como, por ejemplo, la arginina-vasotocina que se encuentra en animales inferiores adultos como única secreción para regular el equilibrio hídrico; la vasopresina y oxitocina de los animales adultos superiores, como reguladoras de dicho equilibrio, aparecen en el postnacimiento. El lóbulo intermedio de la hipófisis, sumamente secretor en el feto de mamíferos, secreta toda suerte de péptidos derivados de la molécula precursora POMC (pro-opio-melanocortina), entre ellos, el péptido intermedio corticotropo (CLIP), que sólo existe en período fetal. Las adrenales fetales presentan una zona llamada «*fetal*» que desaparece después del nacimiento (30) que secreta dehidroepiandrosterona (DHA), un metabolito que utiliza la placenta como sustrato para la síntesis de estrógenos.

En el desarrollo fetal, juegan un papel primordial las secreciones de la placenta, que pueden considerarse secreciones endocrinas ectópicas para el feto. La placenta proviene del huevo fecundado, tiene pues el mismo origen que el embrión y su papel en el desarrollo de éste es fundamental, constituyendo, además, lo que se ha dado en llamar la unidad feto-placentaria que queda muy patente en la colaboración que ejerce la glándula adrenal fetal y la placenta para secretar estrógenos. Además de los estrógenos, la placenta secreta glicoproteínas estructuralmente parecidas a las secreciones pituitarias, como gonadotropina coriónica y lactógeno placentario, además de factores hipotalámicos, como hormona luteotropa (LRH) hipotalámica y tirotrópica (TRH). Podría decirse que la placenta es un órgano eminentemente secretor (31).

El feto de mamíferos tiene, también mecanismos para neutralizar metabolitos, por él circulan masivamente la rT_3 , —triiodotironina revertida— que es inactiva. Sin embargo, la hormona tiroidea tiene un papel importante en el desarrollo fetal; investigaciones recientes de la Doctora Morreale y su grupo, en nuestro país, han mostrado que la tiroxina materna atraviesa la placenta (32).

No podemos detenernos en el sistema endocrino fetal, del cual existen buenas revisiones (33), pero sí debo poner de relieve determinadas cuestiones que muestran la gran implicación de los factores de crecimiento en la proliferación celular que se produce en etapas fetales. Desde los estudios de Alfred Jost en los años 40, se sabe que la hormona de crecimiento no lo es para el feto. Fetos hipofisectomizados *in útero*, y por tanto eliminados los grandes niveles de hormonas de crecimiento que figuran en el feto normal, crecen igual (34). Pero, sin embargo, se conoce que la hipofisectomía provoca una disminución de crecimiento a partir de una determinada etapa fetal, dependiendo de la especie animal que se considere, con más o menos madurez, y, desde luego, provoca un retardo en todas las especies después del nacimiento (34). En una conferencia dada en esta Real Academia y publicada en los Anales en 1978, el Profesor Alfred Jost, con quien yo me formé en París, expuso muchas ideas sobre el crecimiento fetal, y muchas de las cuestiones planteadas parecen comenzar a aclararse hoy por el estudio de los IGFs, de los cuales hablaré más adelante. Jost afirmaba (35) que la encefaloctomía *in utero*, que elimina los factores hipotalámicos, y muchos neuropéptidos, disminuye más el crecimiento fetal que la falta de hormonas pituitarias después de quitar esta glándula. Con respecto a la

insulina, que existe masivamente en la circulación fetal, se sabe que los fetos de madre diabética son siempre grandes, pero ello es debido a que por la hiperglucemia de la madre pasan cantidades masivas de glucosa al feto que estimulan las células β fetales. El aumento de tamaño del feto es debido a que la insulinemia fetal muy alta aumenta su lipogénesis, por ello estos fetos pesan mucho, pero no tienen muy grande el esqueleto. Aunque existe una correlación positiva entre peso fetal e insulina hay datos que muestran que la insulina no parece ser una hormona de crecimiento para el feto (36). De la importancia de la insulina como factor de crecimiento en etapas inmaduras trataré más adelante, sin embargo, hay que señalar aquí que existen determinados estudios que muestran que el papel de la insulina en el crecimiento fetal es permisivo; parece necesaria su presencia, pero no tiene un efecto estimulador directo del crecimiento (37).

Así pues, las hormonas clásicas hipofisarias no parecen ser decisivas para el crecimiento del feto; pero en la circulación de éste existen grandes cantidades de factores de crecimiento como los similares a la insulina (IGF-I y, sobre todo, IGF-II), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento nervioso (NGF) (38). Numerosos factores de crecimiento han sido extraídos de cultivos celulares, como he mencionado, pero no en todos se ha probado su potencialidad proliferativa en organismos vivos. Para los anteriormente mencionados, su actividad ha quedado totalmente establecida en el período fetal.

El EGF, factor de crecimiento epidérmico, estimula la proliferación de la lámina basal en varios epitelios y es un potente mitógeno para células en cultivo de origen ectodermal y mesodermal. Provoca *in vivo* la apertura de ojos y salida de dientes en neonatos. Su efecto no parece restringido a etapas inmaduras, puesto que la exposición en adultos a EGF provoca una incrementada queratinización y, en algunos animales, aumenta el rabo y la parte trasera del pie. El epitelio de la córnea es muy sensible a sus efectos proliferativos. En el feto, sus acciones principales son, sobre todo, el desarrollo del pulmón y del paladar. Tiene, además, en este período, un efecto estimulante en la placenta para la secreción de gonadotropina coriónica. Sin embargo, en el momento actual, gracias al estudio de animales transgénicos que sobreexpresan o inhiben la secreción de EGF, se ha mostrado que éste no es imprescindible para el crecimiento fetal. Contrariamente a esto, hace

tiempo que se conoce la absoluta necesidad del factor de crecimiento nervioso (NGF) para la supervivencia del feto. El NGF fue descubierto y extraído del veneno de serpiente por Rita Levi-Montalcini hacia los años 50 y por todos sus estudios recibió el Premio Nobel (38). *In vitro*, el NGF es requerido en cultivo de neuronas simpáticas adrenérgicas para que sobrevivan. También se sabe que células neoplásicas provenientes de la cresta neural, como células de neuroblastomas o melanomas, fijan el NGF marcado con yodo radiactivo. Es un polipéptido como lo es el EGF, y todos ellos. Existen muchos estudios realizados con NGF en gran parte debidos a la doctora Levi-Montalcini. Por los estudios *in vivo*, se puede concluir que el NGF es absolutamente necesario para el desarrollo fetal y neonatal. El NGF es el factor trófico del cual dependen las neuronas del sistema simpático para sobrevivir y diferenciarse adecuadamente. La más convincente evidencia del papel trófico del NGF sobre el sistema simpático adrenérgico ha sido derivada de experimentos en los cuales se ha suprimido el NGF por el uso de anticuerpos o se ha logrado hipertrofia del sistema simpático por inyecciones locales de NGF. Hoy está totalmente probada su necesidad para el desarrollo por el estudio de animales transgénicos; los animales transgénicos que no expresan NGF no sobreviven (39).

Se cree que el NGF ejerce sus efectos hiperplásicos sobre los ganglios simpáticos promoviendo supervivencia celular más que proliferación. Actúa no solamente en neuronas simpáticas inmaduras sino en otras completamente diferenciadas. Inyecciones de él en ratones jóvenes y adultos conducen a un marcado incremento en la densidad de plexos adrenérgicos. El papel desarrollado sobre el crecimiento fetal por los factores de crecimiento similares a la insulina será tratado en la segunda parte de la exposición, pero hay que señalar aquí que la presencia en el feto, sobre todo del IGF-II, parece también imprescindible para su supervivencia.

Así pues, de todo el cúmulo de secreciones que provienen de la unidad feto-placentaria, los factores de crecimiento, al menos algunos de ellos, son imprescindibles para el desarrollo del feto. También estudios *in vivo* en etapas fetales muestran que los daños en la placenta en etapas gestantes, con interrupción del flujo placentario, que impide la llegada masiva de nutrientes desde la madre al feto a través de ella, son absolutamente nocivos para el desarrollo. Asimismo, es muy necesaria la presencia de la tiroxina para el desarrollo fetal, bien propia del feto o transmitida por la madre.

La regulación del crecimiento fetal en mamíferos superiores tiene una gran similitud con lo que sucede en el desarrollo de animales inferiores. Los animales inferiores interconectan sus células por neuropéptidos o neurotransmisores para mantener su supervivencia, antes incluso de tener un sistema nervioso diferenciado en neuronas. La diferenciación neuronal comienza en animales invertebrados multicelulares, y tan solo en vertebrados podemos hablar de glándulas endocrinas y hormonas clásicas. Sin embargo, el substrato energético, los nutrientes, es imprescindible naturalmente en todas las etapas evolutivas animales. Los nutrientes no solamente son el substrato energético para el crecimiento, sino que regulan factores endocrinos necesarios para éste. El feto de mamíferos necesita, desde un principio, pues, factores de crecimiento, aun en etapas embrionarias, como veremos a continuación, y, además un suministro adecuado de nutrientes para lograr el desarrollo potencial de su crecimiento.

La embriología establece que las pautas de desarrollo embrionarias son dependientes de interacciones intercelulares entre las partes constituyentes del embrión en desarrollo. A través de estas interacciones, se especifica el destino de células o tejidos señalando su posición dentro del embrión. Las moléculas que median estas interacciones fueron llamadas *morfógenos* y su identificación parecía un escalón esencial para la comprensión de las bases moleculares del desarrollo embrionario. La identificación de péptidos y factores de crecimiento en las primeras fases embrionarias hicieron pensar que estos factores podrían jugar un papel importante en la embriogénesis temprana. Actualmente, conclusiones experimentales muestran que estos péptidos pueden especificar el destino de las células embrionarias, es decir, funcionan *in vivo* como morfógenos. Por ello, la investigación de las bases moleculares de la morfogénesis no está enfocada ahora a buscar las moléculas que envían las señales intercelulares, como se hacía en un principio, sino más bien, a tratar de entender cómo traduce la célula la unión de un ligando extracelular, factor de crecimiento o péptido, como señal morfogénica, y no lo traduce como señal mitogénica. Muchos de los estudios se han hecho en embrión de pollo o en anfibio, induciendo el desarrollo de tejidos o alterando las pautas de desarrollo de determinadas células. Los factores de crecimiento más estudiados han sido el epidérmico (EGF), el transformante α (TGF α), la familia del factor transformante β (TGF β), que comprende, entre otros inhibina y activina y el factor «inhibiting mullerian» (40) descubierto por Jost —Premio

Científico de la Ciudad de París 1965—, también la familia del factor de crecimiento fibroblasto (FGF), la familia del factor de crecimiento de plaquetas (PDGF), y los IGFs (IGF-I y IGF-II). Estos estudios están permitiendo la comprensión de las bases moleculares de las pautas embrionarias (41). Determinar cómo sus funciones son integradas por el embrión para generar un animal maduro con los limitados recursos de un cigoto, parece ser el reto de la embriología actual (42).

De las acciones de la familia de la insulina sobre la embriogénesis trataremos más adelante.

2.4. Citoquinas

El sistema endocrino, las hormonas, o más bien el sistema neuroendocrino, dada la interconexión que existe entre el sistema nervioso y las glándulas endocrinas, así como los factores de crecimiento regulan la proliferación celular, la reproducción y el metabolismo, todo ello por secreción de mensajeros químicos, hormonas, factores de crecimiento y neuropéptidos. Con ellos adaptan el organismo a toda suerte de agresiones y factores externos; físicos o de interrelación con otros individuos de su especie, como en el caso de situaciones de pánico o de atracción sexual. Pero existe otra clase de factores que provocan agresiones al organismo por cuerpos extraños como es el caso de las infecciones, y para adaptarse a ellas los organismos vivos disponen del sistema inmune. Durante años no se consideró la posibilidad de unión entre sistema nervioso y sistema inmune. Ambas disciplinas, inmunología y neurociencia realizaban sus investigaciones separadamente. Sin embargo, había muchos datos clínicos que mostraban que estados emocionales repercutían en alteraciones del sistema inmune. Tan sólo a partir de finales de los años 80 se comenzó a hablar de psiconeuroinmunología y, más recientemente, hay datos clínicos que muestran que el tratamiento con psicodrogas puede provocar alteraciones graves del sistema inmune (43). Además, inyecciones microbianas, daños en tejidos, procesos autoinmunes y endotoxinas pueden producir cambios endocrinos en el axis córticosuprarrenal, en los niveles de hormonas tiroideas y en el axis gonadal, e incluso alterar el metabolismo de carbohidratos. Todo esto muestra, sin duda, una interconexión entre sistema neuroendocrino e inmune, como había sido sugerido reiteradamente por datos clínicos. En años recientes, se han hallado mediadores

químicos producidos por linfocitos y monocitos, o sea, por células del sistema retículo endotelial. Primero fueron conocidos estos mensajeros como linfoquinas y monoquinas, según fueran producidos por linfocitos o monocitos respectivamente, y luego han sido bautizados como citoquinas. Además, su producción no se realiza forzosamente en el sistema hematopoyético, ya que se han encontrado secretadas por una variedad de tejidos glandulares no pertenecientes al sistema inmune. En las glándulas endocrinas, estas citoquinas parecen modular sus secreciones endocrinas específicas (44). La lista de citoquinas se va ampliando cada año. Las más relevantes citoquinas son: interleuquinas de 1 a 13, según últimas publicaciones (IL1-13), el factor necrosante de tumores (TNF α y β), interferón (IFN α , β y γ) y factores estimulantes de colonias. Tanto el IL-1 como los TNF son producidos por macrófagos activados y son sintetizados como una gran molécula pro-proteína que luego se divide por proteólisis, exactamente igual que ocurre con la síntesis de factores de crecimiento. Desde tiempo se sabía que la actividad febril que producen las bacterias, y otros pirógenos, parecía mediada por otro pirógeno que se ha identificado como interleuquina 1 (IL-1). Se ha visto que inyectando a ratones esta IL-1 se incrementan en plasma los niveles de hormona pituitaria corticotropa (ACTH) y también el nivel de corticoides. Se han estudiado las posibles acciones de las citoquinas sobre los distintos axis endocrinos cuyas acciones parecen siempre mediadas por una previa acción de la citoquina sobre las secreciones pituitarias correspondientes a cada axis.

Ahora está absolutamente probado que las citoquinas median la respuesta a las infecciones que tienen lugar en el axis adrenocorticotropo secretando corticoides a sangre. Se han realizado experimentos en animales que muestran que las citoquinas aumentan la secreción de corticoides actuando en tres niveles. Nivel hipotalámico, aumentando el CRF factor hipotalámico que estimula la secreción en pituitaria de hormona corticotropa (ACTH), activando la secreción de corticoides en la misma glándula adrenal o a través de una previa secreción pituitaria de ACTH (hormona corticotropa). Además, existe una retroalimentación negativa por la cual los corticoides inhiben la acción de las citoquinas en un proceso inflamatorio. Se ha comprobado que las endotoxinas producen localmente citoquinas tanto en el nivel cerebral como pituitario. En el axis tiroideo, se cree que puedan ser las citoquinas las responsables de la disminución de hormonas tiroideas y de tirotropina pituitaria

en síndromes llamados no tiroideos, como la diabetes y la malnutrición. Estos síndromes cursan con disminución de hormonas tiroideas y, a la vez, de hormona tirotrópica (44). Igualmente, se ha demostrado una disminución de gonadotropinas y de factor hipotálamico gonadotrópico por citoquinas, lo cual explicaría las alteraciones en la reproducción por mediación del sistema inmune. También se les atribuye un papel local de regulación de secreciones hipofisarias.

En los años 90 se ha publicado una serie de trabajos en los que se trata de la regulación transcripcional que provoca el llamado «*manejo helicoidal de hormonas peptídicas*» (45), entre las cuales se incluyen las citoquinas clásicas junto con hormonas como la hormona de crecimiento, prolactina o gonadotropina coriónica placentaria. Tres hormonas que provienen del mismo gen ancestral y tienen una variedad de acciones que se solapan, como ocurre con las acciones de otras citoquinas.

Los receptores de este grupo son polipéptidos y presentan todos un dominio extracelular, una porción transmembrana y un dominio intracelular, como todos los receptores de citoquinas. No parecen tener, como los receptores de factores de crecimiento, actividad tirosin-quinasa intrínseca, pero la fosforilación juega también un gran papel en la regulación de la transcripción que producen estos factores. Sin embargo, actualmente, las diferencias entre factores de crecimiento y citoquinas se están difuminando en cuanto a sus acciones, y ambos se presentan como moduladores de las secreciones del sistema endocrino (46).

3. LA FAMILIA DE LA INSULINA

Estamos viendo que los sistemas de coordinación de los seres vivos, nervioso, endocrino e inmune, tienen interconexiones, ahora bastante bien establecidas, y moduladas por una cantidad enorme de polipéptidos que hemos ido describiendo según la cronología de su descubrimiento; como neuropéptidos, factores de crecimiento y finalmente citoquinas. Estos polipéptidos parecen actuar modulando distintas funciones. Podría decirse que son como un gran engranaje de interconexiones que globalmente modulan y unen las interrelaciones celulares.

Para ejercer su función, se ven obligados a actuar en tejidos diversos, a modular la proliferación celular, las funciones metabólicas y la secreción de hormonas clásicas. Como un ejemplo concreto de ubicuidad y variedad de sus funciones, puede considerarse la familia de la insulina, y concretamente de los factores de crecimiento similares a la insulina, los llamados por el mundo anglosajón los IGFs (insulín-growth factor).

La familia de la insulina comprende: insulina, IGFs y las proteínas transportadoras o ligadoras de IGFs, así como los receptores tanto de insulina como de IGFs. También tendrían que incorporarse a esta familia las proteasas, encontradas recientemente, y que degradan las proteínas transportadoras en determinadas circunstancias. Centraré el estudio en los factores de crecimiento similares a la insulina IGF-I y II, puesto que tienen, en tanto que factores de crecimiento, un papel fundamental como coordinadores celulares en los organismos. De la insulina tan sólo me referiré a su función como regulador del crecimiento, en etapas inmaduras, comparándola con la que sobre éste desempeñan los IGFs. Para ello, destacaré que la insulina, en período fetal, actúa como glucoregulador solamente en la última etapa de la gestación de los mamíferos. El primer dato de correlación entre peso fetal y niveles de insulina lo dan los estudios clínicos de fetos de madre diabética, de lo cual ya he hablado. Estos fetos, por las cantidades enormes de glucosa que la madre les pasa, presentan niveles de insulina circulante muy altos y por ello almacenan grasa. Son fetos no grandes en longitud, sino obesos.

Las células β humanas son reconocibles en feto desde la semana 10 de gestación y, aunque la insulina se encuentra en sangre fetal solamente a las 12 o 14 semanas, el páncreas es insensible a la glucosa hasta aproximadamente las 28 semanas de gestación. Este período en que el páncreas es insensible a la glucosa se encuentra en todas las especies de mamíferos (47). Se cree que paulatinamente después de la aparición de las células β del páncreas éstas reconocen y se estimulan por la glucosa. Además, el preadipocito tiene que desarrollar también, en estas etapas, receptores para insulina que permitan a dicha hormona estimular la lipogénesis. En humano, desde la semana 12 a 24 de gestación, hay una gran proliferación celular en el feto, y después esta proliferación se retarda y comienza, a partir de 24-28 semanas, a aumentar el tamaño celular, coincidiendo con que la insulina ha comenzado a actuar como glucoregulado,

y eso sucede en todas las especies de mamíferos, aunque dichas etapas no coincidan en cuanto a períodos de tiempo concretos (48). Parece que la primera fase de proliferación celular (48) se corresponde con la etapa en la que el páncreas no es sensible a la glucosa, y la insulina circulante no actúa como glucoregulador, sin embargo, el establecimiento de la sensibilidad a la glucosa en el páncreas precede al almacenamiento de gran cantidad de grasa fetal en el último período de la gestación, en el cual la insulina tiene ya un papel importante en la síntesis proteica y la lipogénesis. Así pues, en la primera parte de la gestación, la insulina actúa como un agente anabólico, probablemente implicado en la proliferación celular que tiene lugar, lo que no sabemos es si en estas etapas inmaduras la insulina actúa fijándose a su receptor propio o al receptor de IGF-I, que, como veremos, tiene una gran similitud estructural con el propio de la insulina. Realmente, hay muchas cosas que desconocemos de la actuación de la insulina en la primera parte de la gestación, en la cual parece actuar como factor de crecimiento. Sin embargo, hay una multitud de datos que muestran una correlación positiva entre peso fetal e insulina, y además hay resultados que muestran que los niveles de insulina están siempre altos en el feto. Más aún, la falta de insulina por pancreateomía produce retardo de crecimiento fetal y finalmente muerte. Pero hay que considerar que la insulina, en etapas fetales regula la secreción de IGFs y, por tanto, éstos factores también estarán bajos después de la pancreateomía. Como consecuencia, todos los autores están de acuerdo en que la insulina, en período fetal, tiene una acción permisiva para el crecimiento del feto, tiene que estar presente, pero no parece ser la hormona reguladora específica de su crecimiento. Verdaderamente, y a pesar de la complejidad del sistema endocrino fetal, y de la importancia que tienen, sin duda, determinados factores de crecimiento, como el nervioso o el epidérmico, no se conoce bien cuál es el factor regulador decisivo en el crecimiento del feto. Los factores de crecimiento similares a la insulina parecen ser los candidatos a ello.

Estos factores fueron descubiertos por Salmon y Daughaday en 1957 y los llamaron *somatomedinas* (49). En realidad, estos factores fueron caracterizados por la convergencia de tres líneas de investigación independientes.

La incorporación de ^{35}S sulfato en condroitin-sulfato se utiliza como bioensayo para medir el contenido en suero de hormona de crecimiento (GH). Desde tiempo, se conocía que *in vitro* un

siero normal producía la incorporación de sulfato marcado sobre los glucosa-amino-glicanos del cartílago. Salmon y Daughaday observaron que el suero de ratas sin hipófisis, por tanto sin GH, no producía tal incorporación del azufre radiactivo al cartílago óseo. La observación de estos autores fue que, al añadir GH al medio de cultivo, no se producía tal incorporación; pero si se daba la hormona de crecimiento *in vivo* a estas ratas hipofisectomizadas, y que por tanto carecen de GH, entonces, su suero añadido *in vitro* adquiría la propiedad de fijar el sulfato al cartílago. De ahí, dedujeron que la hormona de crecimiento estimulaba en el animal vivo la secreción de un factor que primero llamaron «factor de sulfatación» y posteriormente, hacia 1972, Daughaday lo rebautizó como *somatomedinas*, debido a que su secreción era estimulada por la hormona somatotropa y, además, mediaba su acción. Posteriormente, se vio que estos factores también producían sobre el cartílago la incorporación de muchos otros substratos marcados, como leucina, uridina y timidina, y se aumentaba la síntesis proteica en el diafragma de ratas. Paralelamente, en una segunda línea de investigación, otros autores estudiaban el hecho de que en el plasma existiera una actividad con efectos anabólicos de aumento de gasto de glucosa por las células, o de lipogénesis celular, exactamente como lo produce la insulina. Esta actividad no se suprimía al tratar los animales con anticuerpos anti-insulina y la llamaron actividad NSILA (non-suppressible insulin-like activity). Finalmente, un tercer grupo de investigación observó que en cultivo de hepatocitos se secretaba un factor que provocaba proliferación celular en cultivo de fibroblastos; Nissley y Rechler le llamaron MSA (multiplicating-stimulating-activity) (50). Por fin, cuando se llegó a la caracterización de los IGFs, se observó que la actividad anabólica similar a la insulina y la actividad promotora del crecimiento del cartílago residían en el IGF-I, y se identificó la actividad proliferativa celular MSA como IGF-II. Antes de seguir adelante, hay que destacar que estas tres líneas de investigación, cuya integración condujo al descubrimiento de los IGFs, reflejan las acciones fundamentales que ejercen estos péptidos en los organismos. Estas acciones son crecimiento del cartílago óseo, acciones anabólicas parecidas a las producidas por la insulina y, por último, una acción proliferativa celular en múltiples tejidos, sobre todo de origen mesodérmico.

La purificación de IGF-I y II, la obtención de sus anticuerpos y el desarrollo de sistemas de inmunoensayo (radioinmunoensayo y

radioreceptor) han hecho posible avanzar enormemente en su conocimiento, y han permitido clarificar el papel que juegan en el crecimiento, diferenciándolo del que tiene la insulina. Además se ha podido establecer la diferencia estructural y de funcionamiento que existe entre estos factores y dicha hormona que señalaré a lo largo de la exposición.

3.1. Estructura y acciones que producen los IGFs y sus proteínas ligadoras

Actualmente, se puede afirmar que los IGFs son multifuncionales e intervienen en una gran variedad de procesos biológicos. Han sido estudiadas sus acciones en sistemas de cultivo celular, y se sabe que tienen funciones importantes en etapas embrionarias, fetales y también en período adulto. En los últimos diez años ha habido una explosión de información al respecto.

La mayor producción de IGFs se realiza en el hígado, y de dicha producción hepática proviene la mayor parte de IGF-I circulante en período adulto. Todo lo cual ha sido establecido por estudios con preparaciones de hígado perfundido (51).

Con el establecimiento de la técnica del ácido desoxiribonucleico recombinante se pudo clonar el ADN complementario (ADNc) copia del ARNm del IGF-I y usar técnicas de hibridación de ADNc/ARNm para medir sitios de síntesis de IGF-I, con lo cual se han detectado múltiples células de diferentes tejidos del organismo que sintetizan IGF-I. También se ha podido establecer su estructura por análisis de los ADN complementarios del IGF-I (IGF-I-ADNsc) y sus correspondientes ARNsm y genes. Puesto que hoy sabemos que su estructura es más complicada de lo que se preveía. El tamaño del gen de IGF-I es muy grande, y dentro de cada especie un simple gen de IGF-I da lugar a una familia compleja de ARN mensajeros (ARNsm) precursores de IGF-I. Ello explica que aunque en 1978 Rinderknecht y Humbel (52) aislaron el principal péptido de IGF-I en período adulto, que contenía 70 aminoácidos, y el IGF-II, que contenía 67 (53), los cuales son los que principalmente se encuentran en el suero humano, se conozca también que, en menor cantidad, existen otras formas variantes.

Estos péptidos parecen tener el 70% de aminoácidos comunes entre ellos, y el 50% de identidad con la pro-insulina; ya que provienen de un gen común que posteriormente se dividió dando lugar a los tres péptidos. Desde el punto de vista evolutivo, se cree que este gen común a la insulina, IGF-I y II, codificaba una molécula precursora de los tres que se duplicó hace alrededor de 600 millones de años, dando insulina e IGFs, y la subsiguiente duplicación, dando IGF-I y II, podría haber tenido lugar hace unos 300 millones de años, cuando los mamíferos aparecieron sobre la tierra.

La hibridación por Northern Blot de ARNm extractado desde una gran variedad de tejidos de rata ha evidenciado que el ARNm de IGF-I e IGF-II se expresa en tejidos no hepáticos, y, comparando la abundancia de la expresión de dichos ARNm en distintos tejidos durante el desarrollo, se han podido establecer los niveles relativos de síntesis de ellos en distintas etapas de desarrollo.

En la rata, el ARNm de IGF-I se expresa en la mayor parte, si no en todos los tejidos, tanto en etapa fetal como posteriormente en rata adulta, pero la abundancia de este ARNm es aún mayor en el feto que en el adulto; por ello se pensó que, en etapas fetales, los IGFs podían jugar un papel importante regulando su crecimiento. Sin embargo, en hígado de adulto se expresa más abundantemente el ARNm de IGF-I que en el hígado fetal, lo cual muestra que la célula hepática, postnatalmente, secreta cantidades mayores IGF-I. Las observaciones de que el ARNm de IGF-II es expresado en más alta cantidad en tejidos fetales, de ratas y humanos, ratifican los resultados previamente obtenidos en plasma y ponen de relieve que en todas las especies existen más altos niveles de IGF-II en etapa fetal que, después, declinan desde el nacimiento. La expresión de ARNm de IGF-II es muy baja o indetectable en hígado, y también en tejidos extrahepáticos de ratas adultas. Una excepción es el cerebro, en el cual es muy significativa la expresión de IGF-II, sugiriendo que este IGF-II regula determinadas funciones del cerebro adulto que actualmente son desconocidas. Así pues, puede afirmarse que el IGF-II es abundante en período fetal, pasando a ser el IGF-I el de niveles más altos, en plasma, después del nacimiento. También análisis de secuencia de los ADNsc de IGF-I (IGF-I/ADNsc) hepáticos muestran, como he indicado, que existen múltiples ARNm de IGF-I que codifican diferentes variantes de éste, pero, de igual manera que no se conoce el papel del IGF-II en cerebro adulto, tampoco sabemos la relevancia funcional de la expresión, dentro de una dada

especie animal, de múltiples ARNsm de IGF-I que codifican distintas secuencias de aminoácidos pertenecientes a diferentes variantes de este polipéptido.

Estudios que abarcan desde 1987 al 93 (51), en distintos laboratorios, han establecido la estructura completa del gen de IGF-I. Este gen es grande, pues abarca más de 80 Kb —kilo bases— de ADN genómico y contiene seis exones. Parece que el gen de IGF-I de todos los mamíferos estudiados hasta la fecha, incluyendo el hombre, es similar al gen de la rata en tamaño y complejidad. También se ha visto, por estudios moleculares, que los hígados de ratas hipofisectomizadas expresan muy poco el ARNm de IGF-I. Y que éste es rápidamente inducido dando inyecciones de hormona de crecimiento, lo cual da soporte molecular a la observación experimental de Salmon y Daughaday de que estos péptidos se producen en hígado estimulados por la GH. Antes de terminar esta sucinta exposición de la estructura de los IGFs, recordaré que estos dos péptidos, junto con la insulina y sus respectivos receptores, así como con las proteínas transportadoras, o ligadoras, constituyen una familia, y aunque sus estructuras tienen muchas homologías, lo cual explica la similitud en sus funciones, y el cruce que presentan, entre ellos, al unirse a sus receptores, se deben destacar sus diferencias comenzando por las estructurales.

Parece que el gen de IGF-I se sitúa en el cromosoma doce en humano mientras que los genes de IGF-II e insulina se localizan en el once. La secuencia de amino-ácidos y la estructura terciaria de IGFs y de insulina, como se ha mencionado, tienen muchas analogías. Los IGFs tienen un dominio A y B en su molécula que se parecen a la molécula A y B de la insulina. Pero estos dos dominios A y B son conectados por el C, que se conserva en los IGFs circulantes, contrariamente a lo que ocurre con la insulina, así pues, hay un 45-50% de semejanza entre estos péptidos y la insulina en los dominios A y B, pero no en el C; esta disimilitud juega un papel importante en la especificidad de unión a sus receptores.

Otra diferencia fundamental se presenta durante su secreción. La síntesis de insulina en las células β se produce por un proceso altamente especializado y complejo (54). El equipamiento enzimático de las células β del páncreas es muy característico, así que la síntesis de insulina no parece poder ocurrir en ninguna otra célula. La pro-insulina es primero procesada a pro-insulina, y el C-péptido es

subsiguientemente separado por un sistema de enzimas específicas. Además, ambos, insulina y C-péptido, son empaquetados en gránulos y secretados al líquido intersticial y a la sangre por exocitosis según un mecanismo activo. Sin embargo, la secreción de los IGFs en el hígado es un proceso mucho menos complicado (55), parecido al de la albúmina. Se secreta también la pre-pro y la pro-IGFs y el procesamiento de estas moléculas es mucho más sencillo que el de la insulina. Una de las causas es que el C-péptido es conservado en los IGFs y no se separa, como ocurre al pasar de pro-insulina a insulina. Esa manera más fácil de secretarse los IGFs ayuda sin duda a la ubicuidad celular de su secreción, contrariamente a lo que ocurre con la insulina. Además, la insulina no parece utilizar en sus acciones más que la vía endocrina y, quizá, la paracrina aunque esta última, tan solo en el páncreas, mientras que los IGFs utilizan vías endocrina, paracrina y autocrina en múltiples tejidos. Otra diferencia muy importante con la insulina es que los IGFs viajan en plasma unidos a proteínas ligadoras, mientras que dichas proteínas ligadoras no se conoce que ligan la insulina.(56)

3.2. Proteínas ligadoras de IGFs

Estas proteínas ligadoras, «binding protein» (IGFBP-1-6) (57), de las cuales se conocen seis, modulan la actividad biológica de los IGFs, ya que solamente el IGF libre, sin proteínas ligadoras, se une al receptor. Además, estas proteínas ligadoras tienen acciones metabólicas independientes de los IGFs. Han sido muy estudiadas los últimos años, y probablemente reservan a la investigación futura nuevos descubrimientos.

El estudio de los IGFBPs ha sido una de las áreas de estudio del axis GH/IGFs que ha tenido últimamente más expansión. Se creyó en un principio que esas proteínas se unían a los IGFs circulantes, y tan sólo limitaban la disponibilidad de IGFs libres y, por tanto, prolongaban su vida media en el plasma. La unión específica a estas proteínas hace que la vida media de los IGFs en el plasma sea aproximadamente de unas 4 horas en la rata y 16 horas en el hombre, mucho más larga que la vida media de la insulina, que es de unos minutos. Estas proteínas son también la causa de que no existan variaciones diurnas para estos IGFs. Cada una de las IGFBPs parece mostrar una distinta pauta de expresión según la etapa de desarro-

llo. El complejo molecular de 30 Kda —kilo-dalton— está formado por IGFBP-1 e IGFBP-2 y es el más abundante en períodos inmaduros —fetal y neonatal— de los mamíferos, mientras el IGFBP-3 de 40-50 Kda, el más abundante en los adultos, constituye con los IGFs un complejo de 150 Kda, formado por el IGFBP-3, la molécula de IGF-1 y una de 80Kda, que es una subunidad ácido-lábil (ALS). El IGFBP-3 es una glicoproteína. Pero, la IGFBP-1 y la IGFBP-2 no son glicoproteínas. La IGFBP-1 se encuentra de 100 a 500 veces en mayor cantidad en el líquido amniótico que en el suero. La IGFBP-2 se halla en el líquido cerebro-espinal, además de en suero. Ambas forman con los IGFs un complejo que pasa el endotelio celular, lo cual tiene el sentido biológico de que por ser más abundantes en etapas inmaduras, facilitan el acceso de los IGFs a las células en etapas de su máximo crecimiento. Sin embargo, la que existe en más cantidad en período adulto, la IGFBP-3, forma con los IGFs un complejo que no pasa el endotelio, en un momento, el adulto, en que la proliferación celular es mucho menos activa. La IGFBP-4 tampoco es glicosilada y, aunque las IGFBP-4-5-6 se conocen menos, los últimos estudios nos dicen que el IGFBP-2, IGFBP-4 y 5 parecen ser las proteínas ligadoras más abundantes en cerebro. La IGFBP 4 y 5 son expresadas, sobre todo, en el plexo coroideo, que es el lugar en donde se secreta más IGF-II, que a su vez es el predominante IGF cerebral. Probablemente, el plexo coroideo es la fuente de donde proviene el IGF-II que existe en el líquido céfaloraquídeo. Ello supone que estos IGFbps estarían regulando el IGF-II libre en dicho líquido, y, por tanto, su actividad biológica. Además, el IGFBP-4 es también expresado en otras regiones cerebrales, como la corteza cerebral. El IGFBP-5 se expresa en el tálamo y el hipotálamo (51). Estas pautas de distribución de los ARNsm de IGFBP-4-5 en cerebro parecen, sin duda, indicar efectos específicos de ellos para modular la compartimentación y acciones de IGF-II cerebral, o quizá también de IGF-1, de todo lo cual, en este momento, conocemos muy poco. Las seis IGFbps son, cada una de ellas, reguladas de distinta forma por hormonas, y también por el estado nutricional (57).

En estado de malnutrición, en etapas inmaduras, el complejo IGFBP-1 y 2 de 30 Kda aumenta, y disminuye la IGFBP-3 (58). Pero, en etapa adulta, en algunas situaciones, como el hipotiroidismo (59), disminuyen ambas, y lo mismo ocurre en la diabetes (58), que puede ser considerada, por falta de insulina, una situación de subnutrición celular. Todo ello ha sido reiteradamente estudiado en nuestro grupo y por otros investigadores (58, 59, 60, 61, 62). No está claro que

exista una relación entre la estructura de estas proteínas (glicosiladas o no y con mayor o menor número de cisteínas) y su función. Es de destacar que algunas de estas proteínas ligadoras unen IGF-II con una gran afinidad, pero ninguna de las seis IGFbps se unen a IGF-1 con afinidad preferente (57). Parece evidente que las funciones de estas proteínas ligadoras son mucho más importantes que simples proteínas transportadoras (63). Estructuralmente, estas IGFbps, son ricas en cisteína. La mayor reserva en plasma de IGF-1 en adulto esta formando el complejo con la IGFbp-3. Este complejo es regulado por enzimas proteasas específicas que fueron descubiertas debido a que aumentan en la circulación materna durante la gestación, y más aún en gestaciones de fetos múltiples. Y ello parece una adaptación para dejar el IGF-1 libre en la circulación materna y que pueda ser utilizado por el feto. También se ha descubierto esta actividad aumentada en diabéticos no tratados, en los cuales al suministrar insulina, disminuye la actividad (64). De alguna manera, la proteólisis de IGFbp-3 en la circulación parece regulada por la insulina. La presencia de insulina disminuye la actividad proteasa del mismo modo que su presencia disminuye los niveles de IGFbp-1 (64).

No cabe duda de que estas proteasas regulan los niveles de las proteínas ligadoras y, por consiguiente, la disponibilidad de los IGFs en la circulación, pero queda mucho por descubrir de ellas en el futuro. Cuando se estudian las variaciones de las proteínas ligadoras de IGFs en animales diabéticos, aunque básicamente sus alteraciones son las mismas que encontramos en animales subnutridos, existen adaptaciones específicas, y modulaciones en los diabéticos debidas a la falta de insulina (58).

Muy recientemente, se han encontrado polipéptidos que estructuralmente se parecen a las IGFbps, son ricos en cisteína y tienen otras similitudes estructurales. Hwa y otros, en 1999, publicaron un artículo (65) hablando de la *superfamilia* de las proteínas ligadoras de IGFs. Según la nomenclatura establecida por Dayhoff en 1978, las proteínas que tienen una similitud en aminoácidos mayor del 50% pueden ser consideradas una familia, y cuando dicha similitud es menor del 5% una *superfamilia* (66). Esta *superfamilia* comprende una serie de proteínas de las cuales se ha extraído y clonado su ADN. Son unos polipéptidos que tienen dominios estructurales parecidos a las IGFbps. La primera de esta *superfamilia* que se aisló se bautizó como IGFbp-7, creyéndola otra proteína ligadora de IGFs,

pero, finalmente, teniendo en cuenta su similitud con las proteínas ligadoras clásicas, se ha llamado a todas IGFBP-rPs (insulin-like factor binding protein related protein). Aún no conocemos bien sus funciones. Se unen a los IGFs con unas 100 veces menor afinidad que las proteínas ligadoras clásicas, pero de forma específica. Sin embargo, estas proteínas poseen también afinidad por la hormona de crecimiento, por la prolactina, y por el péptido C de la pro-insulina. Recientemente, se ha descubierto que una de ellas, la IGFBP-rP1, se une a la insulina al menos con la misma afinidad que a los IGFs, lo cual no sucede con las proteínas ligadoras clásicas (IGFBPs-1-6) que no se unen a la insulina nunca y, contrariamente, lo hacen con alta afinidad a los IGFs. La función de estos polipéptidos de la nueva superfamilia puede ser la de modular de alguna manera a los IGFs, o bien tener otras funciones que actualmente desconocemos. Esta superfamilia es un ejemplo de lo mucho que queda por investigar acerca de estas proteínas ligadoras de IGFs.

3.3. Receptores

La fosforilación de residuos de tirosina es una de las modificaciones covalentes claves que utilizan los organismos pluricelulares, durante la embriogénesis, para efectuar la intercomunicación celular, y también para el mantenimiento de sus tejidos en el período adulto. Las enzimas que llevan a cabo el proceso son las protein-tirosin-quinasas (PTKs). Estas enzimas catalizan el tránsito del γ fosfato de ATP a residuos de tirosina del sustrato proteico. Estos procesos celulares tan importantes están regulados rigurosamente. Las PTKs están situadas o bien en la membrana del receptor (RPTKs) o bien fuera del receptor (PTKs). Tanto las citoquinas como los factores de crecimiento se unen a receptores que envían sus señales produciendo fosforilación de residuos de tirosina, pero los receptores de citoquinas son más sencillos, y la actividad protein-quinasa no es intrínseca a su receptor; un ejemplo concreto es el receptor de la hormona de crecimiento, la cual actualmente está considerada como una citoquina. Sin embargo, los factores de crecimiento, y también la insulina, tienen receptores que poseen actividad protein-quinasa intrínseca y, por tanto, se autofosforilan y, además, son receptores más complicados estructuralmente que los de las citoquinas. Los receptores de IGF-I y la insulina son glicoproteínas que contienen dos subunidades α y β , unidas por puentes disulfuro (67). Entre dichos receptores cambian, solamente, ciertos

aminoácidos en algunos dominios, además, también son diferentes los lugares donde están situados determinados residuos de tirosina (67). El receptor IGF-I presenta una cierta heterogeneidad con variaciones en su estructura como diferente glicosilación. También existen receptores híbridos que fijan con igual afinidad la insulina y el IGF-I. Se cree que puede haber más de un gen que exprese el receptor de IGF-I, y se sabe que este receptor se encuentra en múltiples tejidos del organismo y en cualquier etapa del desarrollo que se considere. Eso explica por qué el IGF-I puede producir sus acciones en tantos tejidos.

Las señales que emite el complejo receptor-ligando, tanto en el caso de la unión citoquina-receptor, con actividad protein-quinasa extrínseca, o como en el caso de factor de crecimiento-receptor con actividad protein-quinasa intrínseca, han sido ampliamente estudiadas. En el primer caso, como ejemplo típico, se ha estudiado la unión de la hormona de crecimiento, una citoquina, a su receptor, y en el segundo caso se han investigado, fundamentalmente, las señales que emite la insulina que se une al mismo tipo de receptor que los IGFs

El receptor de GH es un receptor simple transmembranal como el de cualquier citoquina. Este tipo de receptor es, pues, un componente crítico para la regulación del sistema inmune. También regula las acciones de la prolactina, y, naturalmente, la acción de las interleuquinas, factor estimulante de colonias y, en general, de todas las citoquinas. Aunque no puedo entrar a exponer a fondo la ruta de señales que estos receptores desencadenan, en cada caso concreto, al unirse a sus ligandos (68), diré que el receptor de GH está sujeto a modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales durante su síntesis. La más significativa de ellas es la generación de una proteína ligadora soluble (GHBP) que proviene del dominio extracelular del receptor y cuyos mecanismos para secretarla son distintos según la especie animal que se considere; en alguna especie es por proteólisis. Estos receptores de citoquinas utilizan la familia de tirosin-quinosas llamadas JAK (janus activated kinase) (68) que están asociadas de forma no covalente con el dominio citoplásmico de estos receptores. Estas tirosin-quinosas, una vez activadas por la unión del complejo citoquina-receptor, fosforilan a la familia llamada STATs (signal transduction of activators of transcription) que transducen señales y activan la transcripción uniéndose a secuencias específicas del ADN. En la transducción de señales del receptor de

citoquinas activado se induce fosforilación de proteínas llamadas embarcadero IRS (insulin-receptor-substrate), que también están implicadas en la cascada de señales que generan los receptores de insulina, IGF-I y, en general, de otros factores de crecimiento.

En el caso del receptor de la insulina, de IGF-I y de muchos otros factores de crecimiento, por la actividad tirosin-quinasa que posee el receptor, se autofosforilan sus residuos de tirosina, como se ha indicado, después de activado el receptor, por unión a su ligando respectivo. Este receptor recluta así mismo la familia de proteínas llamadas embarcadero, las IRS, que a su vez son fosforiladas en residuos tirosina. Estas proteínas se asocian y activan el fosfatidilinositol-3-quinasa cuya vía es utilizada también en las señales de las citoquinas al unirse a su receptor. La significación fisiológica y la repercusión en las funciones posteriores de estas rutas comunes entre factores de crecimiento y citoquinas no se conocen.

En la actualidad la cascada de señales que produce el receptor activado de IGF-I está bastante aclarada, ya que ha sido estudiada en los últimos años comparativamente a las señales producidas por los receptores de insulina, del factor de crecimiento de plaquetas (PDGF) o de factor de crecimiento epidérmico (EGF). Inclusive, últimamente, se están realizando estudios muy interesantes acerca de la familia MAP-quinasas (mitogen activated protein) de serina/treonina-quinasas que pueden regular diversas vertientes de las proteínas celulares y nucleares, incluyendo factores de transcripción. Estos estudios están permitiendo aclarar las rutas moleculares que conducen desde la unión del factor de crecimiento a su receptor de superficie y posteriormente al núcleo celular (69). No puedo entrar a exponer los aspectos moleculares y celulares del receptor de IGF-I detalladamente (67), pero sí diré que dicho receptor liga con gran afinidad el IGF-I, y también la insulina, aunque en este último caso con afinidad disminuida unas quince veces. Ambos receptores de insulina e IGF-I tienen la actividad tirosin-quinasa situada en la unidad β que es donde presentan mayor parecido estructural. Aunque existe un receptor para IGF-II, el manosa-6- fosfato (M-6-P), que es mucho más simple estructuralmente y que no posee actividad tirosin-quinasa, este receptor ha sido identificado con el receptor que une proteínas glicosiladas lisosomales. Hoy se cree que todas las acciones conocidas de IGF-II se realizan a través del receptor de IGF-I, y que el receptor M-6-P tendría como función regular la cantidad de IGF-II presente en un medio degradándolo cuando hay

una acumulación de este factor. Los receptores de IGF -I e insulina son regulados por los niveles de estos factores en el medio; disminuyen cuando la insulina y el IGF- I aumentan «*regulación a la baja*» (down regulation). El receptor de IGF- II fija al IGF- II, y también el IGF- I, pero no la insulina.

3.4. Acciones de los IGFs

Expondré las acciones de los IGFs haciendo especial mención de las últimas investigaciones publicadas en años muy recientes y efectuadas sobre animales transgénicos.

Comenzaré por describir las funciones de la familia de la insulina en período embrionario. Hasta aproximadamente la mitad de los años 80, estubo ampliamente extendido el punto de vista de que las hormonas jugaban un papel en el desarrollo tan sólo en las últimas etapas de éste; de ninguna manera, en el período embrionario, el cual se consideraba absolutamente regido por factores genéticos. Ello estaba inspirado por la concepción que se tenía del sistema endocrino; por la idea de que las hormonas se secretaban en glándulas y viajaban por la sangre para ejercer sus acciones; siendo así que las glándulas no estaban diferenciadas en período embrionario. De ello, se deducía que el desarrollo en este período se producía sin la presencia de hormonas. Pero con el descubrimiento de estos polipéptidos de que he venido hablando, llámense factores de crecimiento o citoquinas, el concepto de hormona clásica ha sido completamente superado en los últimos años. Además, se supo pronto que la insulina, una hormona de concepción clásica, secretada en adulto por el páncreas, estaba presente en los embriones de pollo, concretamente, en el día dos del embrión, y posteriormente se encontró también el ARNm de la insulina (70). En la actualidad, los sitios de producción de la insulina, en estas etapas embrionarias, no están aún identificados, ya que son etapas enormemente inmaduras y las células del páncreas no están diferenciadas, ni la circulación establecida. Además, la insulina está actuando, sin duda, como un factor de crecimiento, de forma autocrina o paracrina. Si se dan anticuerpos anti-receptor de insulina se producen similares malas consecuencias a las que tienen lugar dando anticuerpos anti-insulina. Hoy sabemos que los receptores de insulina se encuentran ampliamente extendidos en los tejidos del embrión de pollo, sobre todo, en tejidos de origen ectodermal como el sistema nervioso. El receptor de IGF-I que puede

mediar las acciones de la insulina, como he dicho, se encuentra expresado con más abundancia en estos períodos embrionarios que el de la insulina. Se ha visto que, si se administran nanogramos de insulina a un embrión de pollo de dos días, se aumenta enormemente su desarrollo morfológico y bioquímico. Con respecto al IGF-I, se conoció pronto su presencia en el humor vítreo del embrión de pollo, en donde parece regular la diferenciación de las células del cristalino. Su ARNm se encuentra muy expresado en el embrión de un día. Se ha propuesto que, en el pollo, la insulina y el IGF-I actúan coordinadamente en las primeras etapas embrionarias. También se ha estudiado la influencia de estos factores sobre la metamorfosis de los anfibios. Concretamente, en una rana sudafricana, la *Xenopus laevis*, se ha observado la inducción por ellos del mesodermo (71). Sobre todo, se ha visto la influencia de la familia del TGF β (factor de crecimiento transformante β) en el desarrollo temprano de la gástrula de dicha rana, y la existencia en ella, durante el desarrollo, de los receptores de insulina e IGF-I (42).

Estos últimos años por observaciones con el microscopio electrónico y por inmunocitoquímica, en embrión de pollo, mosca *Drosophila* y en algunos mamíferos como el ratón, se ha estudiado la unión de factores de crecimiento, sobre todo los IGFs, a sus receptores marcados con isótopos radiactivos. El descubrimiento de que polipéptidos, actuando como hormonas, pueden regular la embriogénesis desde animales inferiores al hombre, muestra que estas sustancias, y también la insulina, han sido muy conservados por los seres vivos a través de la evolución. La comprensión de la importancia del papel desempeñado por los oncogenes en la producción de tumores ha puesto de relieve que el conocimiento del control de la proliferación celular durante el desarrollo, así como su regulación por factores de crecimiento, es de sumo interés para llegar al entendimiento de los procesos neoplásicos. Otra idea que se desprende de los estudios de la regulación de la embriogénesis por factores hormonales en distintas especies, es el hecho de que la insulina debe dejar de ser considerada tan sólo como una hormona de animales vertebrados, que se secreta en el páncreas, y que tiene un papel importante como glucoregulador celular en músculo y en adipocito. La insulina se ha encontrado, desde los animales inferiores a los mamíferos, no sólo en período fetal sino en etapas tempranas embrionarias, en períodos en que las células del páncreas no están en absoluto diferenciadas, y, por consiguiente, tiene que ser secretada por otro tipo de células; en algunas especies se ha hallado en el

intestino. Hoy conocemos también que la insulina estimula ARN y síntesis proteica en músculo y en hígado. Estudios sobre líneas celulares en cultivo, muestran que la insulina estimula síntesis de ADN y crecimiento celular. Es decir, se puede pensar, por los resultados de rigurosos estudios experimentales, que la insulina parece actuar durante el desarrollo como un verdadero factor de crecimiento de forma clásica.

En cuanto a las acciones de los IGFs, se cree que el IGF-I es un regulador primario del crecimiento, desde etapas muy tempranas del desarrollo hasta la vida postnatal e, incluso, durante el período adulto. Parece que el IGF-II y la insulina ejercen acciones sobre el crecimiento celular en etapas muy inmaduras, pudiendo aumentar el crecimiento incluso en células todavía no diferenciadas. Como he dicho, los IGFs actúan significativamente sobre el crecimiento celular del sistema esquelético produciendo anabolismo, pero, además, sabemos que sus acciones se realizan en múltiples tejidos del organismo y son factores reguladores del crecimiento en período embrionario, ya que están ampliamente distribuidos en las células durante este período. Puede concluirse, pues, que la familia de la insulina está toda ella implicada en el crecimiento desde etapas muy tempranas del desarrollo. Esta familia, y sus receptores, parecen jugar un papel importante en el metabolismo y diferenciación celular desde el desarrollo embrionario.

Se han realizado múltiples estudios en muchas especies animales en etapas inmaduras, pero la mayor dificultad metodológica ha sido que estos péptidos están presentes en muy pequeñas cantidades, en dichas etapas, y es difícil detectarlos. En períodos de preimplantación del embrión de ratón, solamente fueron identificados transcritos de IGF-II, pero no los de IGF-I o de insulina. Los estudios sobre ratón confirman, sin embargo, la presencia de la familia de la insulina en etapas muy primarias embrionarias. En dicho momento, estos factores pueden provenir de la madre, o de fuentes del propio embrión, como se ha sugerido para el IGF-II. Datos experimentales sugieren que este IGF-II actuaría en células diferenciadas mientras el IGF-I activaría el crecimiento de células troncales y promovería su diferenciación. El IGF-II y la insulina parecen provocar en el embrión proliferación celular mientras el IGF-I, y otros factores de crecimiento, sólo actuarían cuando la diferenciación se produce. En los estudios de estas acciones embrionarias de la familia de la insulina no pueden dejar de citarse los trabajos de Flora de Pablo (71).

Resumir las acciones de los IGFs en los organismos vivos es tarea difícil. Estas acciones se realizan siempre en dos vertientes características; la puramente anabolizante celular, al modo de las acciones que ejerce la insulina, o bien acciones de proliferación y diferenciación celular en múltiples tejidos, sistema esquelético, ovario, testículos, sobre la hipófisis regulando sus secreciones, sistema hematopoyético, regulando la linfopoyesis, o regulando la miogénesis en tejido muscular. Además, a nivel celular, parecen regular no solamente la proliferación sino también la apoptosis celular, es decir, la muerte celular programada. Todo ello por citar las acciones más ampliamente estudiadas (72, 73, 74, 75).

Como veremos más adelante al tratar de *la hipótesis somatomedina*, o sea al estudiar las acciones de los IGFs sobre el sistema esquelético, estos factores son secretados, en adulto, mayoritariamente en el hígado, estimulada su secreción por la hormona de crecimiento (GH), pero pronto se descubrió que en los mamíferos, en período fetal, se secretan de forma independiente de la GH. Trabajos de nuestro grupo, establecieron que dicha independencia de GH también la presenta la rata neonatal (58). En estos trabajos se establece que, en períodos inmaduros de la rata, la regulación de la secreción en hígado de los IGFs se realiza con dependencia del equilibrio insulina/ nutrientes (58,60) y lo mismo dedujimos estudiando la regulación de la secreción de IGFs en ratas neonatales hipotiroideas (76). Estos resultados fueron ratificados por nuestro grupo por estudios *in vitro* sobre hepatocitos fetales en cultivo primario (61). Todo ello confiere a la insulina un papel regulador importante en etapas inmaduras, modulando además unos factores, los IGFs, que están absolutamente implicados en la estimulación del crecimiento. Conviene destacar esta cuestión porque los estudios sobre el papel de la insulina, no como hormona glucoreguladora sino como verdadero factor implicado en el desarrollo, han sido frecuentemente olvidados.

La secreción de los IGFs es absolutamente dependiente, en cualquier edad que se considere (62,77,78), del estado nutricional. Esta regulación de la secreción de péptidos por nutrientes, y muy particularmente por glucosa, se ha encontrado para enzimas glicolíticas (79), pero es muy relevante en el caso de los IGFs. Debe subrayarse el hecho de que el crecimiento en los organismos vivos es absolutamente dependiente del balance energético (80), y por tanto no es extraño que estos IGFs, que disminuyen en estados en que se altera el

anabolismo, como la subnutrición, la diabetes o el hipotiroidismo estén, a su vez, implicados en la estimulación del crecimiento.

3.4.1. *El axis somatotropo en el año 2001*

Los IGFs son, por tanto, compuestos integradores de múltiples sistemas. Desde su descubrimiento por Salmon y Daughaday, hace medio siglo, como mediadores de las acciones de la hormona de crecimiento sobre el sistema esquelético, concretamente sobre el crecimiento del cartílago óseo, el campo de sus acciones se ha ampliado considerablemente. Pero, además, su acción a nivel celular se realiza en dos direcciones antagónicas, como son la proliferación celular, que supone el control del ciclo celular, y la apoptosis o muerte celular programada, y ambos son procesos celulares implicados en las regulaciones neoplásicas, en la tumorigénesis. Debido a ello, en el año 2000, Khandwala, Friend *et al.* (81) publicaron una revisión de trabajos en donde se relatan los experimentos llevados a cabo en numerosos ensayos, por distintos investigadores, tratando de utilizar los factores IGFs para la terapéutica de diversos cánceres. El estudio abarca desde aplicaciones para curar glioblastomas y meningiomas, neoplasias del sistema gastrointestinal, cáncer de colon, etc., cánceres pancreáticos, esofágicos, hepatomas, neoplasias pulmonares, cáncer de tiroides, de ovario, endometriales y vaginales, cánceres prostáticos, y, por supuesto, todo tipo de neoplasias de hueso y piel (81).

Todas las acciones posibles de los IGFs sobre tumores neoplásicos se deben encuadrar, naturalmente, dentro de las funciones que estos factores realizan sobre la proliferación celular. Pero, además, hay que considerar las acciones que el IGF-I realiza, cuando, en el adulto, actúa como glucoregulador sobre el metabolismo, provocando anabolismo celular al estilo de la insulina, y por estas funciones ha sido utilizado para corregir la hiperglucemia que presentan pacientes diabéticos con resistencia a la insulina, y para mejorar el estado catabólico surgido en determinadas situaciones patológicas, ya que al suministrar IGF-I recombinante se reduce el balance nitrogenado negativo de determinadas situaciones, por ejemplo, el asociado con la restricción calórica. También se han utilizado los IGFs en modelos animales para recuperar episodios isquémicos en hipoxias cardíacas. Todo ello muestra su implicación enorme en procesos metabólicos. Por otra parte, por ser su secreción dependiente del estado nutricional y disminuir con la restricción calórica, hoy se

cree que son mejores marcadores de dicho estado que la albúmina o la transferina, que eran las sustancias utilizadas de manera clásica. Esta breve revisión da una idea actual de la ubicuidad de sus lugares de acción y de la variedad de sus funciones. Debemos reseñar también que, desde 1996 al año 2001, existen estudios monográficos que relatan la implicación de los IGFs, en la miogénesis (82), en la linfopoyesis y funciones del sistema inmune (83), y en las secreciones de la pituitaria (84). Así mismo, están implicados en la comunicación intercelular de la adenohipófisis (85).

Voy a centrarme en las concepciones actuales del llamado axis somatotropo, es decir, en cómo actúan estos factores IGFs en el sistema esquelético, propiciando el crecimiento óseo, y en cómo se concibe ahora la cooperación que ejercen, en dicho proceso, la hormona de crecimiento y los IGFs. Primero diré algo sobre la acción de la hormona de crecimiento (GH), según concepciones actuales, para ayudar a la mejor comprensión de este axis somatotropo. Como se sabe, la GH es segregada por las células somatotropas de la pituitaria. A pesar de su nombre, es fundamentalmente una hormona metabólica. Estructuralmente, pertenece a una familia de hormonas polipeptídicas que comprende, además de ella, la prolactina y la hormona placentaria gonadotropina coriónica, que como he dicho, es sintetizada por los sintiotrofoblastos. Se ha estudiado bien la estructura y evolución del gen de esta familia (86). El hecho del control de la secreción de GH, estimulado en la pituitaria por el factor hipotalámico (GRF, growth releasing factor) e inhibida su secreción por el somatostatín (GIF, growth inhibiting factor), factor hipotalámico inhibidor, ha permanecido en el conocimiento actual, pero hoy sabemos que, además de estos factores hipotalámicos, actúan en concierto con ellos, para su secreción, factores que derivan del estado metabólico periférico, como los ácidos grasos libres circulantes. Estos ácidos grasos actúan directamente sobre la pituitaria, e inhiben la secreción de la GH, produciéndose una verdadera retroalimentación negativa, puesto que la GH provoca lipólisis. Además, la hormona del tejido adiposo leptina (80) estimula la secreción de GH actuando sobre el factor hipotalámico estimulante de GH o, también, a través del neuropéptido Y, ya que la leptina inhibe este neuropéptido Y, que, a su vez, inhibe la GH (80). Recientemente, se han aislado péptidos en la periferia, como el *hexarelin*, que activan la secreción de GH. Así que su secreción, en el nivel de conocimiento actual, está regulada por péptidos hipotalámicos y por otras señales que vienen de la periferia, no del sistema nervioso central.

En el año 2001, puede decirse que la GH es una citoquina (87) por muchas razones, pero, sobre todo, porque sus acciones las realiza uniéndose a un receptor transmembranal que es el primero y el más conocido de la familia de receptores de las citoquinas, de los cuales ya he hablado. Como se dijo anteriormente, estos receptores utilizan como sustratos las mismas proteínas IRS llamadas embarcadero que emplean los receptores de la insulina y también de los IGFs. La activación de este receptor provoca la asociación de las proteínas IRS-1 y 2 con fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI-3-quinasa), como sucede con el receptor de IGF-1 y de insulina. Ello ha hecho que se haya investigado si muchas acciones metabólicas de GH son específicas o las realiza a través de receptores de insulina, o IGF-1, ya que existen cruces de señales cuando estos factores hormonales se unen a su receptor. Sin embargo, hasta el momento actual, no se ha estudiado la posible confluencia de GH en las acciones mitogénicas de IGF-1.

En los últimos tiempos, con la ayuda de animales transgénicos que no expresen el gen de IGF-1 o de su receptor, o bien eliminando el gen del receptor de GH, se ha intentado averiguar qué funciones son específicas de uno u otro factor hormonal. Tampoco se conoce aún si las acciones de GH sobre el balance de nitrógeno las realiza o no a través de su efecto estimulador de IGF-1 en hígado.

Por perfusión de ^{14}C -leucina se ha observado que la GH incrementa la síntesis proteica en todos los tejidos. Se ha comparado sobre voluntarios humanos la acción de la hormona de crecimiento, de IGF-1 y de insulina sobre la síntesis proteica. Los tres factores hormonales la aumentan, pero el IGF-1 más. Hoy se piensa que muchas de las acciones de la GH en el músculo se realizan a través del IGF-1. Con técnicas de biología molecular, se ha podido ratificar que, como concluyeron Salmon y Daughaday en 1957, efectivamente la GH estimula la expresión del gen de IGF-1, y de muchas de sus proteínas ligadoras en hígado. Las acciones fisiológicas de la GH podrían definirse como un tropismo generalizado que envuelve múltiples órganos y sistemas. Sus acciones sobre el crecimiento y metabolismo las efectúa la hormona de crecimiento estimulando procesos anabólicos y la secreción de factores de crecimiento estimuladores o inhibidores de la proliferación celular. Además, existe evidencia de que la hormona de crecimiento se sintetiza también en lugares extrapituitarios, como hipotálamo lateral, linfocitos, tímocitos y neutrófilos, es decir, se puede afirmar que es verdadera-

mente una citoquina. Incluso se conoce que la GH actúa por vía paracrina y autocrina, pero en dicho caso sus efectos son mediados por una previa estimulación de IGF-I en los tejidos o bien de otros factores (87) La hormona de crecimiento se secreta en la circulación de forma pulsátil, siendo más marcado dicho ritmo en machos que en hembras. En fetos de mamífero, el crecimiento, como se ha indicado, es totalmente independiente de la GH: Sin embargo, postnatalmente, la GH pulsátil rige el crecimiento, y dicho efecto es muy relevante en la pubertad.

Así pues, sobre todo en el hígado, la GH estimula la secreción de IGF-1, hasta el punto de que los niveles de este factor circulantes tienen siempre procedencia hepática, pero la GH también estimula localmente la secreción de IGF-1 en diversos tejidos, principalmente en el hueso, provocando en este caso proliferación y diferenciación de los condrocitos, y dando como resultado el crecimiento de la epífisis de la placa ósea, seguido por su calcificación. La GH induce aumento de colágeno y proliferación de osteoblastos a través de procesos que son IGF-1 dependientes.

La cooperación de IGF-1 y GH en el crecimiento de los huesos ha dado lugar a la concepción de varias hipótesis. La primera, llamada *hipótesis somatomedina*, se estableció al descubrir las somatomedinas o IGFs en 1957. Según esta hipótesis, la estimulación en hígado por la hormona de crecimiento de la secreción de IGF-1 aumenta los niveles en sangre de IGF-1 circulantes, y ellos son los que regulan el crecimiento del hueso. Esta concepción fue posteriormente sustituida por la *hipótesis dual*, que rectifica la primera y afirma que la GH estimula en hígado, pero también en el propio hueso, la secreción de IGF-1, y el hueso crece. Se llama dual porque se comprobó que la propia hormona de crecimiento tiene acciones específicas, no mediadas por IGF-1, sobre el sistema óseo. Finalmente, en los últimos años, la experimentación con animales transgénicos ha venido aún a modificar el planteamiento anterior elaborando lo que recientemente Le Roith bautizó como *hipótesis somatomedina de 2001* (88).

Para llegar a ella, se han recogido todas las experiencias sobre animales transgénicos que no expresan, o bien sobreexpresan, receptores de IGF-1, de GH o de los propios genes de IGF-1 y GH. Con estos experimentos, se ha ratificado la total independencia del desarrollo fetal y embriológico de la hormona de crecimiento, puesto que

embriones y fetos que no expresan receptor de GH crecen igual, así como se ha establecido su gran dependencia de los factores IGFs. Se ha visto que inyecciones de GH son más efectivas para el crecimiento óseo que el IGF-1, y este factor más eficaz que la hormona de crecimiento para el desarrollo de bazo y riñón. También se ha conocido que las acciones de IGF-1 sobre el ovario y el útero son independientes de la hormona de crecimiento, puesto que ratones que no expresan el receptor de GH son fértiles, y, sin embargo, son infértiles si no expresan el gen de IGF-1. Se ha comprobado que la hormona de crecimiento estimula la secreción de proteínas ligandoras en el hígado, modulando así la acción biológica del IGF-1.

En estos animales transgénicos, se han estudiado las acciones específicas, o no, de la insulina y el IGF-1. Se sabe que el IGF-1 aumenta las proteínas corporales por dos vías: incrementando síntesis proteica, o inhibiendo proteolisis, mientras la insulina aumenta la síntesis proteica solamente por inhibición de la proteolisis (89). Se ha podido detectar en qué circunstancia el IGF-1 actúa fijándose a su receptor, como sucede en el músculo, y cuándo actúa fijándose al de insulina, como sucede cuando aumenta la captación de glucosa en tejido periférico. Pero aún no se sabe que papel desempeñan los receptores híbridos de IGF-1 e insulina que fijan ambos.

Con estas técnicas transgénicas, se han podido estudiar también las acciones de los factores de crecimiento *in vivo* sobre el ciclo celular, y ello ha modificado la noción de factor progresivo y competente que fue establecida para todos los factores de crecimiento por estudios *in vitro* sobre cultivos celulares.

Estos mutantes que no expresan, o sobreexpresan, el gen de GH, IGF-1 o sus receptores han permitido el estudio de las interrelaciones entre ambos factores en cuanto al crecimiento del hueso. Han mostrado que en el crecimiento óseo existen efectos de GH y de IGF-1 que son independientes uno del otro y, así mismo, se ha puesto de relieve que existe una retroalimentación negativa en pituitaria por parte del IGF-1 circulante con respecto a la secreción de la hormona de crecimiento, ya que el GH es muy alto en animales que no expresan el IGF-1.

Con técnicas recombinantes que utilizan un bacteriófago, se ha logrado eliminar el gen de IGF-1 sólo en hígado, y no en otros tejidos. Se ha visto que los animales así tratados tienen muy alta la GH

en plasma porque está muy disminuido el IGF-I en suero; sin embargo, crecen igual y además son fértiles. Ello supone un buen desarrollo del ovario en ausencia de niveles normales en sangre de IGF-I. Para explicarlo, se ha tratado de conocer si la secreción de IGF-I localmente en los tejidos ováricos aumenta, pensando que actuaría de forma paracrina, y compensaría los bajos niveles plasmáticos de IGF-I, pero no se ha logrado demostrar ese aumento. Sin embargo se ha observado en estos animales que el IGF-I libre, el no ligado a proteínas ligadoras, es normal. Todo ello sugiere que el IGF-I circulante en plasma parece tener, tan sólo, la función de regular en la pituitaria la secreción de GH, la cual, si estuviera muy alta y no hubiera una sustancia que la inhibiera, provocaría graves perturbaciones metabólicas y de todo tipo. También se comienza a sugerir si en el crecimiento óseo solamente actúa el IGF-I libre, el no unido a proteínas ligadoras, pero, en el momento actual, de este IGF-I libre no sabemos aún, realmente, cómo se regula ni donde se produce.

No obstante tampoco hay que olvidar que en el crecimiento óseo también juegan un papel los esteroides sexuales, que indudablemente modulan las acciones y secreción de los IGFs sobre el hueso. Todo esto, unido a la variedad de tejidos en que los IGFs se expresan, lo mismo que sus receptores, constituye un grave inconveniente para que puedan ser utilizados ampliamente en terapéutica en los trastornos pediátricos de crecimiento (90). Por tanto, y a pesar de sus acciones indudables sobre el crecimiento de los huesos, hay que destacar las muchas contraindicaciones que presentan los IGFs para su uso en la clínica médica (91). Ellas son derivadas del desconocimiento de muchas cuestiones. Los estrógenos producen aumento del crecimiento en estatura, pero se ha visto que dados en dosis altas suprimen los niveles de IGF-I circulante. Así pues, se tiene conocimiento de la colaboración de los estrógenos con los IGFs en sus acciones sobre el sistema óseo, pero se desconocen las interrelaciones entre ambos y, también, con otras hormonas, como la paratohormona, reguladora del metabolismo cálcico. Se diría que el hecho conocido de que los receptores de IGFs estén tan ampliamente extendidos en muchos tejidos, lo cual es una de las cuestiones, desde un punto de vista biológico, más interesantes en ciencia básica, limita, sin embargo, su uso en clínica. (91).

Las técnicas de mutación genética, sin duda, nos están aportando multitud de conocimientos, aclaran la gran cooperación que existe entre hormona de crecimiento e IGFs en el desarrollo del hueso.

También muestran que, en dicho desarrollo, tienen, además, cada uno de ellos acciones específicas, independientes uno del otro. Pero, sobre todo, ponen de relieve la gran complejidad de este sistema somatotropo GH/IGFs y sus proteínas ligadoras. No obstante, hay que señalar que, aunque las técnicas para inactivar genes sean, sin duda, un poderoso instrumento de estudio, no hay que olvidar que en este caso se trata de genes que expresan polipéptidos muy fundamentales como reguladores del desarrollo, y, por tanto, importantes para la supervivencia de los organismos vivos. En consecuencia, habrá que preguntarse si, desde un punto de vista biológico, este modo de estudio será el adecuado para poder predecir lo que pasará en estado adulto o en etapas más avanzadas del desarrollo de estos animales transgénicos. No conocemos hasta qué punto otro gen podría compensar la pérdida de aquel que quitamos, ya que se desconoce la capacidad de adaptación de los organismos vivos a este nivel. También quiero destacar que no conocemos casi nada del posible papel que puedan jugar los IGFs en el cerebro, en el cual se expresan abundantemente sobre todo el IGF-II, así como sus receptores. Todo ello se suma a las muchas incógnitas que este complejo sistema GH/IGFs reserva a la investigación futura.

4. CONCLUSIONES Y REFLEXIONES SOBRE LAS INTERCONEXIONES CELULARES Y LA FAMILIA DE LA INSULINA

«En la Naturaleza no hay superior ni inferior, ni cosas accesorias y principales. Estas jerarquías que nuestro espíritu se complace en asignar a los fenómenos naturales, proceden de que, en lugar de considerar las cosas en sí y en su interno encadenamiento, las miramos en relación a la utilidad o el placer que puedan proporcionarnos».

RAMÓN Y CAJAL, *Los tónicos de la voluntad*, 1898

Creo que, como dije al principio de este trabajo, esta familia de la insulina, y concretamente el axis GH/IGFs, es un buen ejemplo de la gran capacidad y variedad de interconexiones celulares que son capaces de realizar en los organismos animales estos neuropéptidos, factores de crecimiento, o citoquinas de los cuales hemos venido hablando. Ellos, junto con las hormonas clásicas, son los mensajeros químicos que establecen la interrelación de los tres sistemas de comu-

nicación celular en los organismos vivos: sistema nervioso, endocrino e inmune, y dicha unión existe siempre a través de la filogenia de todas las especies animales. Los neuropéptidos, los factores de crecimiento y citoquinas son los encargados de interconectar las células en animales inferiores, cuando todavía no existe muy diferenciado el sistema nervioso e incluso cuando aparece éste totalmente diferenciado en invertebrados multicelulares, y estamos comprendiendo que siguen haciéndolo muy posteriormente en animales vertebrados, cuando ya se han diferenciado las glándulas endocrinas.

A principios del siglo XXI, nos enfrentamos con una idea absolutamente global y unitaria de las interconexiones celulares, según la cual la idea de sistema endocrino diferenciado en glándulas es simplemente un caso particular y puntual que pertenece a todo un engranaje, muy anteriormente aparecido en las especies animales, de interconexiones celulares por polipéptidos, que se encuentra en todas las especies animales desde los invertebrados a mamíferos superiores.

Gracias a los estudios sobre animales, que han permitido hacer endocrinología comparada, hemos ido asistiendo durante todo el siglo XX al descubrimiento de neuropéptidos por los cuales hemos conocido la naturaleza eminentemente secretora de la neurona. Hemos extraído de cultivos celulares y de suero fetal polipéptidos con gran actividad mitogénica, que hemos llamado factores de crecimiento. Primero hemos creído que actuaban tan solo en células vecinas a la que los secretaba, de forma paracrina, o en la misma célula de donde provenían, de forma autocrina, para luego descubrir que viajan también en sangre como verdaderas hormonas de forma clásica.

Se descubrieron las citoquinas secretadas por el sistema inmune, por células hematopoyéticas, que son igualmente polipéptidos, y que además están implicadas en la modulación de la secreción de hormonas clásicas en las propias glándulas endocrinas o que son capaces de actuar como verdaderos factores de crecimiento en el ciclo celular.

Es decir, durante todo el siglo XX, cuando hemos sido capaces de descentrarnos de nuestros problemas patológicos concretos de mamífero superior humano y hemos abordado el estudio de las interconexiones celulares como problema biológico de las especies

animales, la endocrinología comparada, enormemente ayudada por técnicas finas de genética y biología molecular, nos ha ido mostrando que muchas veces habíamos estado hablando de cosas parecidas con distintos nombres, pero que conceptualmente eran muy similares. Ahora sabemos, incluso, que los receptores de citoquinas y factores de crecimiento, que son estructuralmente diferentes, una vez activados por unirse a su ligando, propagan señales con cascadas de proteínas fosforiladas bastante comunes a ambos, todo lo cual nos comienza a sugerir cómo puedan modularse entre ellos.

Hoy más que nunca, en este sistema unitario de interconexiones celulares tiene vigencia la concepción de Sistema Neuroendocrino Difuso que propuso Pearse en 1969, o la hipótesis de Fujita en 1980 acerca de la existencia de familias de neuronas y paraneuronas eminentemente secretoras y que existen diseminadas en los tejidos de todas las especies animales desde seres inferiores al hombre.

5. SISTEMA NEUROENDOCRINO DIFUSO «APUD» CELULAS

«El nuevo paradigma científico o un indicio suficiente para permitir una articulación posterior, surge repentinamente, a veces en medio de la noche en la mente de un hombre sumergido profundamente en la crisis».

THOMAS S. KUHN, *La estructura de las revoluciones científicas*, 1962.

El nombre de familia de «APUD» células fue puesto por Pearse en 1969, queriendo con ello reflejar en este acrónimo que son células que tienen como propiedad captar aminas precursoras y decarboxilarlas. APUD son las iniciales de la expresión inglesa *«amino precursor uptake and decarboxilation»*. Como la mayor parte de las concepciones científicas, tuvieron un trabajo antecedente en las células que el patologista austriaco Friedrich Feyrter (1895-1973) (92) describió en 1943-53 como un sistema de células claras (*«hellen Zellen»*) que constituían un *«órgano epitelial endocrino difuso»*, según relata el propio Pearse. Son células identificadas por el microscopio óptico y electrónico como células que tienen todas las características estructurales para producir proteínas y que están diseminadas en multitud de epitelios. Basándose en esta concepción de Feyrter, imaginó Pearse, y publicó en sus trabajos (93,94), que estas células,

diseminadas en los tejidos de los organismos vivos, tenían como característica común la de secretar polipéptidos captando aminas y decarboxilándolas, por eso las llamó APUD células. Estas células, según su concepción, deberían proceder todas del neuroectodermo, como las del sistema nervioso. Concretamente, Pearse dice en 1969 que provendrían, como las células nerviosas, del «*ectoblasto progredado neuroendocrino*».

Posteriormente, elaboró el concepto de que dichas células constituirían un Sistema Neuroendocrino Difuso («DNES») (94) que él divide en dos partes: la que llama División Central, constituida por partes del sistema nervioso, como hipotálamo, *pars inintermedia* de la pituitaria y neurohipófisis, cuyas células secretan productos amina, bien conocidos, y con un origen neuroectodermal claro; y la que llama División Periférica del DNES, en donde están encuadradas las células de la médula adrenal, ganglios simpáticos, piel, pulmón, tracto intestinal, páncreas, estómago e intestino. A partir de esta concepción, se hizo un gran esfuerzo experimental para encontrar el origen neuroectodermal de todos estos tejidos, utilizando marcadores neuronales de todo tipo. El origen neuroectodermal ha sido difícil de encontrar para algunas de estas células, como las del tracto gastrointestinal o las células del páncreas, y Pearse concluye que en etapas muy previas, muy primarias del desarrollo del embrión, estas células adquieren sin duda un «*estatus neuroendocrino*». Termina afirmando que esta familia de APUD células constituyen una tercera división del sistema nervioso además del central y simpático o autónomo, y, como ellos, tienen un programa y designio neuroendocrino.

La concepción de Pearse es, sin duda, un intento globalizador que recoge los resultados y conclusiones de Scharrer acerca de la neurosecreción como característica de las neuronas, que intenta actualizar conceptos y unificar resultados incluyendo todos los hallazgos de nuevos neuropéptidos que, durante esos años, se venían produciendo. La tercera división del sistema nervioso constituida por las células APUD es una idea muy nueva para la época, y es un intento de la mente humana, como sucede siempre con el trabajo innovador, por conciliar nuevos hallazgos con dogmas establecidos previamente, y, por tanto, muy arraigados. La idea de la familia de células APUD es una síntesis muy creativa conceptualmente que trata de abarcar los nuevos resultados sobre polipéptidos dentro de los planteamientos ya establecidos. Pero, sin embargo, en las concepciones de Pearse hay dos puntos fundamentales, que constituyen

dos limitaciones; primero están centradas en la neurosecreción de polipéptidos, y, segundo, las células que los producen tienen que poseer, por tanto, un origen nervioso.

Años más tarde, desde un punto de vista puramente morfológico, puesto que se trataba, fundamentalmente, de un histólogo, Tsuneo Fujita (95), recogiendo y basándose en las células APUD de Pearse, llegó a conclusiones aún más unificadoras (95) Observó, en primer lugar que ni las neurofibrillas ni los cuerpos de Nissl eran características morfológicas específicas de las neuronas, como se venía diciendo, y que tanto neuronas como células neuroepiteliales contienen vesículas sinápticas neuronales y gránulos de secreción propios de células endocrinas. Por otro lado, encontraba vesículas sinápticas, como en las neuronas, en células endocrinas. Además, rebatió las aseveraciones de Pearse acerca de que las neuronas fijen aminas y que los derivados de éstas sean una secreción característica de las neuronas más abundantes que lo puedan ser sustancias biológicamente activas como el ATP u otros nucleóticos adenilicos. Fujita afirma que las células endocrinas y las células sensoriales, que él llama neuroepiteliales, son en su naturaleza y funciones asimilables a las neuronas, y las llama paraneuronas. Realmente, el concepto de paraneurona lo establece estudiando las células endocrinas del intestino que están dispersas en la mucosa gastro-entérica. Afirma que algunas de estas células permanecen abiertas al lumen intestinal y se excitan a través de un quimiorreceptor que poseen. Establece que estos receptores se estimulan en su porción abierta por sustancias del bolo alimenticio, igual que sucede con las células gustatorias de la lengua, que reconocen información química de los alimentos.

Estudiando morfológicamente las células del páncreas, las de los alveolos pulmonares o los pinealocitos de la glándula pineal a través de las especies animales, desde los animales inferiores al hombre, establece que estas paraneuronas, en los animales inferiores, son abiertas y se estimulan por factores del medio circundante. En el páncreas y la glándula pineal, los animales inferiores, tienen, respectivamente, un quimiorreceptor sensible a la glucosa o un fotoreceptor sensible a la luz abiertos al exterior, y en la evolución de las especies estas paraneuronas se van envolviendo hasta convertirse en cerradas. En esta evolución, en los humanos han perdido sus receptores abiertos al exterior pero siguen regulando sus secreciones por la luz en la pineal a través de la previa secreción de noradrenalina o bien, en el caso del páncreas, se forman células β cerradas que se estimulan por la gluco-

sa sanguínea. Fujita y su grupo hicieron todo un estudio a través de las especies, en donde se puede seguir en algunos tejidos toda esa evolución, desde neuronas abiertas a cerradas. En la *Hydra japónica*. un celentéreo, encontraron, con el microscopio electrónico, representación de paraneuronas abiertas al exterior - antecesoras de neuronas y paraneuronas cerradas parecidas a las del tracto gastro-intestinal humano. Fujita mostró, pues, que, en este celentéreo, existen células que se abren al exterior por un cilio y se estimulan por agentes externos; así como células abiertas al lumen intestinal, y otras que serían las antecesoras de las células del tracto gastro-intestinal de los mamíferos superiores actuales, del hombre. Recogiendo los esfuerzos experimentales y afirmaciones de Pearse, Fujita concluye que, aunque el origen ontogénico de las paraneuronas es variable, y unas tengan claramente origen neuroectodermal y otras aparentemente no, todas ellas, neuronas y paraneuronas, son células que tienen «*un designio genético idéntico, secretor, similar a las neuronas*» (95).

6. REFLEXION FINAL

«... Desde el punto de vista de esta nueva doctrina humoral, la fisiología y la morfología de cada órgano aparecen como resultantes de multitud de estímulos químicos...»

JOSÉ CARRACIDO, *Química Biológica*. 1924.

A comienzos del siglo XXI, resulta interesante esta frase del Dr. Carracido cuando habla de las hormonas y las secreciones internas...resulta premonitora, y muy creativa, dado el escaso nivel de conocimiento de estas cuestiones en 1924. Pero, en este comienzo de siglo, la concepción de sistema endocrino se ha globalizado. Hemos asistido a una verdadera revolución científica conceptual en endocrinología. Las interconexiones celulares por mensajeros químicos, hay que concebirlas como una gran red de polipéptidos secretados por neuronas o paraneuronas localizadas en muchos tejidos por células, como dice Fujita, con «*designio genético neuroectodermal*» y eminentemente secretor, como ya en los años 20 deducía Scharrer de sus estudios sobre animales. Podríamos decir que existe un Sistema Neuroendocrino Difuso, como estableció Pearse en 1969, pero extendido a lo largo de los tres sistemas clásicos de coordinación celular: sistema nervioso, endocrino e inmune.

Sin embargo, como afirmaba Cajal «*en general, no hay cuestiones agotadas, sino hombres agotados en las cuestiones*» (96). El primer problema que parece presentarse, pues, cara al futuro es el conocimiento de cómo se interrelacionan estas secreciones, estos polipéptidos, y cómo estas interconexiones de sustancias secretadas en los tres sistemas que conocemos se adaptan a factores externos de todo tipo para poder mantener la homeostasis orgánica lo más estable posible, o sea la salud de los individuos. Para todo ello, quedan muchas vertientes por investigar, y quizá, sin abandonar, sino todo lo contrario, las finas tecnologías de la genética y biología molecular, sea el momento, en la investigación endocrina futura, de volver a observaciones del organismo completo que nos permitan llegar a conclusiones sobre estas interrelaciones entre mensajeros químicos sobre las cuales todavía existen muchas incógnitas, como se ha visto a lo largo de esta exposición.

Hoy más que nunca, estas conexiones celulares por sustancias químicas que estudia la endocrinología tienen un carácter unitario, interrelacionado, cuyo dinamismo nos queda por descubrir en muchos aspectos. Se diría que hemos llegado a una concepción unitaria de las interconexiones celulares habiendo antes parcelado su estudio y encontrando con ello de forma eficaz los mensajeros químicos en los tres sistemas de coordinación establecidos, nervioso, endocrino e inmune; pero en los albores del siglo XXI, para descifrar todas las interrelaciones de estas sustancias químicas y las posibilidades de cooperación entre ellas, que solo atisbamos actualmente y no conocemos, habrá que habilitar modelos experimentales que observen de nuevo al organismo entero con todo su dinamismo, y lo sometan a situaciones que permitan estudiar las posibilidades adaptativas de las conexiones celulares ubicadas en cualquier tejido o sistema, y todo ello de la manera, y con los modelos, más fisiológicos posibles.

He dicho.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Berson S.A. and Yalow R., «Radioimmunoassay: a status report», in «Immunology», Good R.A. and Fisher D.W. (eds) (Stamford, Conh. Sinaver Associates), 1971.
- (2) Bayliss W.M. and Starling E.H., «The mechanism of pancreatic secretion», *J. Physiol.* 28: 325, 1902.
- (3) Berthold A.A., «Trasplantation der hoden», *Arch. Anat. Physiol. U. Wiss. Med.* 16: 12, 1849.
- (4) Brown-Sequard C.E., «Des effets produits chez l'homme par des injections sous-cutanée, d'une liquide retiré des testicules frais de cobaye et chien», *C.R. Soc. Biol. (Ser 9) 1*: 4-15-19, 1889.
- (5) Wilson J.D., «Charles-Eduard Brown-Sequard and the centennial of endocrinology» *J.Clin Endocrinol. Metab.* 71: 1403-9, 1990.
- (6) Wilson J.D., «Endocrinology: survival as a discipline in the 21 st century?» *Ann. Rev. Physiol.* 62: 947-50, 2000.
- (7) Du Vigneaud V., «Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin», *Harvey Lectures 1954-55*, Academic Press, 1956.
- (8) Palay S.L., Sotelo C., Peter S.A. and Orkand P.M., «The axon hillock and the initial segment» *J. Cell. Biol.* 38: 193, 1968.
- (9) Green J.D. and Harris G.W., «The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis», *J. Endocrinol.* 5: 136-46, 1947.
- (10) Harris G.W. and Green J.D., «Neural control of the pituitary gland», Ed. Arnold, London, 1955.
- (11) Schally A.V., Bowers C.Y., Redding T.W. and Barrett J.F., «Isolation of thyrotropin releasing factor (TRF) from porcine hypothalamus», *Biochem. Biophys. Res. Commun* 25: 165, 1966.
- (12) Guillemin R., Sakiz E. and Ward D.N., «Further purification of TSH releasing factor (TRF) from sheep hypothalamic tissues with observation on the amino acid compositions», *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118: 1132, 1965.
- (13) Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J. and Guillemin R., «Hypothalamic Polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone». *Science* 179: 77-79, 1973.
- (14) Speidel C.C., «Gland-cells of internal secretion in the spinal cord of the skates», *Carnegie Insti. Washington Publ.* N° 13: 1-13. 1919.
- (15) Kopeć S., «Studies of the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis», *Biol. Bull.* 42: 323-42, 1922.
- (16) Von Euler V.S., and Gaddum J.H., «An unidentified depressor substance in certain tissue extracts», *J. Physiol.* 72: 74-87, 1931.
- (17) Scharrer E., «Die lichtempfindlichkeit blinder elritzen (untersuchungen über das zwischenhirn der fische I.)», *Z. Vol. Physiol.* 7: 1-38, 1928.
- (18) A.M. Pascual-Leone, «Hipotálamo: neuronas endocrinas y secreciones internas», in *Curso Monografico sobre Neuroquímica*, Edit. Universidad Complutense, Madrid, 1985.

- (19) Scharrer B., «Neurosecreción: Beginning and new direction in neuropeptides research», *Ann. Rev. Neurosci.* 10: 1-17, 1987.
- (20) Scharrer E. and Scharrer B., «Secretory cells within the hypothalamus», *Res. Public. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 20: 170-94, 1940.
- (21) Krieger D.T., «Brain peptides», *Vitamins and Hormones* 41: 1-25, 1984 .
- (22) Pearse A.G.E. and Takor-Takor T., «Embryology of the Diffuse Neuroendocrine System and its relation of the common peptides», *Federation Proc.* 38: 2288-94, 1979.
- (23) Roth J. and LeRoith D., «Intercellular communication. The evolution of scientific concepts and messenger molecules», in: *Medicine, Science and Society Symposia celebrating in the Harvard Medical School Bicentennial* ed. K.J. Isselbacher pp.425, New York, Wiley, 1984.
- (24) James R. and Bradshaw R.A., «Polypeptide growth factors», *Ann. Rev. Biochem.* 53: 259-92, 1984.
- (25) Devel T.F., «Polypeptide growth factors: roles in normal and abnormal cell growth», *Ann. Rev. Cell Biol.* 3: 443-92, 1987.
- (26) Heldin C.H. and Westermark B., «Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes», *Cell.* 37: 9-20, 1984.
- (27) Sefton B.M. and Hunter T., «Tyrosine protein kinases» *Adv. Cyclic Nucleotides Protein Phosphorylation Res.* 18: 195-226, 1984.
- (28) Jost A., «Experiences de decapitation de l'embryon du lapin», *C. R. Acad. Sci., Paris* 225: 322, 1947.
- (29) Moore C.R., «Embryonic sex hormones and sexual differentiation», in Thomson W.O. (ed) *A monograph in American Lectures in Endocrinology.* Springfield Ill. CC Thomas, 1947.
- (30) Pascual-Leon A.M., «Características endocrinas fetales. Anormalidades congénitas», in, «Bioquímica Perinatal. Aspectos básicos y patológicos». Fundación Areces. 1988.
- (31) Pascual-Leone A.M., «Hormonas placentarias. Factores endocrinos en el desarrollo perinatal y neonatal», In, «Bioquímica Perinatal», Fundación Areces, 1989.
- (32) Morreale de Escobar G., Obregon MJ and Escobar del Rey F., «Transfer of Thyroid Hormones from mother to the fetus», in *Research in Congenital Hypothyroidism*, Eds: F. Delarge, DA Fisher, D. Glinioer, Plenum Press, New York, USA. A169, 15-29. 1989.
- (33) Fisher D.A., «The unique endocrine milieu of the fetus», *J. Clin. Invest.* 78: 603-611, 1986.
- (34) Jost A., «Anterior pituitary function in fetal life», in, «The pituitary gland», eds: Harris G.W. and Donovan B.T. 2: 299, Butterworths, London 1966.
- (35) Jost A., «Les facteurs endocriniens de la croissance prenatale et neonatale», *Anales de la Real Academia de Farmacia XLIV* n° 4, 1978 .
- (36) Girard J., Rieutort M., Kervran A. and Jost A., «Hormonal control of fetal growth with particular reference to insulin and growth hormone», 5th European Congress of Perinatal Medicine Uppsala Sweden – 9-12 de junio 1976.
- (37) Cooke P.S. and Nicoll C.S., «Role of insulin in the growth of fetal rat tissues», *Endocrinol.* 114: 638-43, 1984.

- (38) Levi-Moltalcini R., «Developmental neurobiology and the natural history of nerve growth factor», *Ann. Rev. Neurosci.* 5: 341-62, 1982.
- (39) Gospodarowicz D., «Epidermal and Nerve growth factors in mammalian development», *Ann. Rev. Physiol.* 43: 251-63, 1981.
- (40) Josso N., Catc R.L., Picard J.L., Vigier B., De Clemente N., Wilson C., Imbeaud S., Blake Pepinsky R., Guerrier D., Boussin I., Legeail L. and Carré Eusébe D., «Anti-Mullerian hormone: the Jost factor», *Recent Progress in Hormone Research* 48: 1-59, 1993.
- (41) Whitman M. and Melton D.A. «Growth factors in early embryogenesis», *Ann. Rev. Cell Biol.* 5: 93-119, 1989.
- (42) Klein P.S. and Melton D.A., «Hormonal regulation of embryogenesis: the formation of mesoderm in *Xenopus Laevis*», *Endocrine Reviews* 15: 326-41, 1994.
- (43) Ader R., Felten D., and Cohen N., «Interactions between the brain and the immune system» *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 561-602, 1990.
- (44) Imura H., Fukata J.I. and Mori T. «Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine system», *Clinical endocrinology* 35: 107-115, 1991.
- (45) Horseman N.D. and Li-Yuan Yu-Lee, «Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin and hematopoietic cytokines», *Endocrine Rev.* 15 (5): 627-49, 1994.
- (46) Kennedy R.L. and Jones T.H., «Cytokines in endocrinology: their roles in health and in disease», *J. of Endocrinology* 129: 167-78, 1991.
- (47) Milner R.D.G. and Hill D.J., «Fetal growth control: the role of insulin and related peptides», *Clinical Endocrinol* 21: 415-33, 1984.
- (48) Widdowson E.M., Crabb D.E. and Milner R.D.G., «Cellular development of some human organs before birth», *Archives of Diseases in Childhood* 47: 652-56, 1972.
- (49) Salmon W.D. and Daughaday W.H., «A hormonally-controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro», *J. Lab. Clin. Med.* 49: 815-36, 1957.
- (50) Nissley S.P. and Rechler M.M., «Multiplication stimulating activity (MSA): a somatomedin-like polypeptide from cultured rat liver cells», *National Cancer Institute Monograph* 48: 167-77, 1978.
- (51) Lund P.K. «Insulin- growth factor-1: molecular biology and relevance to tissue-specific expression and action», *Recent Progress in Hormone Research* 49: 125-49, 1994.
- (52) Rinderknecht E. and Humbel RE, «The amino acid sequences of human insulin like growth factor I and its structural homology with proinsulin», *J. Biol. Chem.* 253: 2769, 1978.
- (53) Rinderknecht E. and Humbel RE, «Primary structure of human insulin like growth factor II», *Febs Letter* 89: 283, 1978.
- (54) Wollheim C.B. and Sharp G.W.G., «Regulation of insulin release by calcium», *Physiol. Rev.* 61: 914-73, 1981.
- (55) Schwander J., Hauri C., Zapf J. and Froesch E.R., «Synthesis and secretion of insulin like growth factor and its binding proteins by the perfused rat liver», *Endocrinology* 113: 297-303, 1983, *Letter* 89: 283, 1983.

- (56) Froesch E.R. and Zapf J., «Insulin-like growth factor and insulin: comparative aspects», *Diabetologia* 28: 485-93,1985.
- (57) Rajaram S., Baylink D.J. and Mohan S., «Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and function», *Endocrin Reviews* 18(6): 801-831,1997.
- (58) Rivero F. Goya L., Alvarez C. and Pascual-Leone A.M., «Effects on undernutrition and diabetes on serum and mRNA expression of IGFs and their binding proteins during rat development», *J.Endocrinol.* 145: 427-40,1995.
- (59) Ramos S., Goya L., Martín M.A., Escrivá F. and Pascual-Leone A.M., «Influence of hypothyroidism on circulating levels and liver mRNA expression of IGF-binding proteins». *J. of Endocrinology* (en prensa).
- (60) Goya L., Rivero F., Martín A.M., Arahuetes R., Hernández E. R. and Pascual-Leone A.M., «Effects of refeeding of undernourished and insulin treatment of diabetic neonatal rats on IGFs and IGF-BPs». *Am. J. Physiol. (Endocrinol and Metab)* E223-231,1996.
- (61) Goya L., Puente A., Ramos S., Martín A.M., Escrivá F., and Pascual-Leone A.M., «Regulation of insulin growth factor IGF I and II by glucose in primary cultures of fetal hepatocytes». *J. of Biological Chemistry* 274(34): 4633,1999.
- (62) Thissen J.P., Ketelslegers J.M. and Underwood L., «Nutritional regulation of the insulin-like growth factors», *Endocrine Reviews* 15 (1): 80-111,1994.
- (63) Jones J L and Clemmons D R, «Insulin-like growth factors and their binding proteins. Biological actions», *Endocrine Reviews* 16 (1): 3-33, 1995.
- (64) Giudice LC, «IGF-binding protein-3 protease regulation». *J.Clinical Endocrinol and Metab.* 80 (8): 2279, 1995.
- (65) Hwa V, Youngman O.H. and Rosenfeld R.G, «The insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) Superfamily», *Endocrin. Reviews* 20 (6): 761-787, 1999.
- (66) Dayhoff M.O. «Atlas of protein sequence and structure», National Biomedical Research Foundation, Washington D.C. p.5, 1978.
- (67) LeRoith D., Werner H., Beiter-Johnson D., and Roberts C.T.junior, «Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor receptor». *Endocrin Reviews* 16 (2): 143 -163, 1995.
- (68) Hubbard R. and Till J.H., «Protein Tyrosine kinase structure and function», *Ann. Rev. Biochem.* 69: 373-98, 2000.
- (69) Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Bing-Exu, Karandikar M., Berman K. and Cobb M.H., «Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological function», *Endocrina Reviews* 22 (2): 163, 2001.
- (70) De Pablo F. and Roth J, «Endocrinization of the early embryo: a emerging role for hormone and hormone-like factors», *Tibs* 15: 339,1990.
- (71) De Pablo F., Scott L.A., and Roth J., «Insulin and Insulin-like growth factors in early development: peptides, receptors and biological events», *Endocrin Reviews* 11 (4): 558,1990.

- (72) Zapf J and Froesch ER, «Insulin-like growth factors /somatomedins: Estructure, secretion, biological actions and physiological role», *Hormon Research* 24: 121-130,1987.
- (73) Froesch ER, Schmid Chr., Schwahder J., and Zapf J., «Actions of insulin -like growth factors», *Ann. Rev Physiol.*47: 443-67,1985.
- (74) Werner H., Adamo M.,Robert C.T and LeRoith D., «Molecular and cellular aspec of insulin-like growth factor action», *Vitamins and Hormones* 46: 1,1994.
- (75) Cohick WS and Clemmons DR, «The insulin -like growth factors». *Ann. Rev. Physiol.*55: 131-53,1993..
- (76) Ramos S, Goya L., Alvarez C., and Pascual-Leonc A.M., «Mechanism of hypothyroidism action on insulin-like growth factor I and II from neonatal to adult rats: insulin mediates thyroid hormone effects in the neonatal period», *Endocrinol.*139: 782,1998.
- (77) Strauss DS, «Nutritional regulation of growth factors that control mammalian growth», *FASEB J.* 8: 6-12. 1994.
- (78) Clemmons DR.and Underwood I.E, «Nutritional Regulation of IGF I and IGF-binding protein», *Ann.Rev.Nutr.*11: 393, 1991.
- (79) Vaultant S., and Kahn A., «Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates», *FASEB J.*8: 28,1994.
- (80) Pascual-Leonc AM, «Regulacion del crecimiento: axis GH/IGFsc hipótesis neuroendocrina». Conferencia dada en Real Academia de Farmacia el 18 mayo 2000 (en prensa en *Anales Real Academia*).
- (81) Khandwala HM, McCutcheron IE, Flyvbjerg A and and Friend KE, «The effects of insulin-like growth factor on tumorigenesis and neoplastic growth», *Endocrine Reviews* 21(3): 215-244,2000.
- (82) FlorineJR, Daina Z., Ewton and Coolican SA, «Growth hormone and the insulin-like growth factors system in myogenesis», *Endocrine Reviews* 17(6): 481-671, 1996.
- (83) Clark R, «Somatogenis hormones and insulin-like growth factor-1:stimulators of lymphopoiesis and inmune function», *Endocrine Reviews* 18(2):157-59,1997.
- (84) Ray D.and Melmed S., «Pituitary cytokine and growth factor expression and action», *Endocrine Reviews* 18 (2): 206-29,1997.
- (85) Schwartz J., «Intercellular communication in the anterior pituitary», *Endocrine Reviews* 21 (5): 488-513,2000.
- (86) Miller W L,and Eberhardt N.I, «Structure and evolution of the growth hormone gene family», *Endocrine Reviews* 4 (2): 97-130,1983.
- (87) Waters M.J, Shang C.A, Behncken.N, Tam SP, Li H, Shen B. and Lobie PE, «Growth hormone as a cytokine», *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26: 760-64,1999.
- (88) LeRoith D., Bondy C., Yakar C., Jun-Li Liu and Butler A., «The somatomedin hypothesis 2001», *Endocrine Reviews* 22: 53 -61, 2001.
- (89) Fryburg DA, Jahn LA, Hill SA, Oliveras DM, and Barrett EJ, «Insulin and insulin-like growth factor I enhance human skeletal muscle protein anabolism during hyperaminoacidemia by different mechanisms», *J.Clin.Invest.*96: 1722, 1995.
- (90) LeRoith D and Butler A.A., «Insulin-like growth factors in pediatric health and disease», *J.Clinical Endocrinol and Metabolism* 84 (12): 4355,1999.

- (91) VanWyk J.J. and Smith IP, «Insulin-like growth factors and skeletal growth:possibilities for therapeutic interventions», J. Clinical. Endocrinol. and Metab. 84 (12): 4349, 1999.
- (92) Feyrter F R, «Über die these von peripheren endokrinen drusen», Wiener Zett. Inncr. Med. 27: 9-38 1947.
- (93) Pearse A.G.E., «The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologie and pathologic implications of the concept», J.Histochem. Cytochem.17: 303-13,1969.
- (94) Pearse A.G.E., «The Diffuse Endocrine (Paracrine) System:Feyrter's concept and its modern history», Verch. Dtsch. Ges. Pathy. 61: 2,1977.
- (95) Fujita Tsuneo, Shigeru Kobayashi, Ryogo Yui and Toshihiko Iwanaga, «Evolution of Neuron and Paraneuron», in, «Hormones, adaptation and Evolution», (S.Ishii et al eds) 35-43.. Japan Sci. Soc.Press, Tokyo/Springer-Verlag Berlin,1980.
- (96) Santiago Ramon y Cajal, «Los tónicos de la voluntad», Ed. CSIC 1982.