



Facultad de Medicina, UNAM Departamento de Bioquímica



Mensaje Bioquímico

**EDITORES: J. Oria Hernández; E. Rendón Huerta;
H. Reyes Vivas; I. Romero Álvarez; I. Velázquez López.**

MENSAJE BIOQUÍMICO

EDITORES:

**JESÚS ORIA HERNÁNDEZ
ERIKA RENDÓN HUERTA
HORACIO REYES VIVAS
IRMA ROMERO ÁLVAREZ
ISABEL VELÁZQUEZ LÓPEZ**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

VOL. XXXI

2007

Dedicado a la Memoria del Dr. Félix Córdoba Alva

PORTADA

Torre de la Rectoría
Ciudad Universitaria
Universidad Nacional Autónoma de México

DISEÑO

Lic. Julieta Ambriz Laguna
Lic. Liliana Garrido

ORGANIZADOR

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNAM**

Derechos reservados conforme a la ley
©2007. Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D. F.

ISSN-0188-137X

MENSAJE BIOQUÍMICO es una publicación anual, editada por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Interior de la Ciudad Universitaria, México, D.F., 04510. Editor Responsable JESÚS ORIA HERNÁNDEZ. Número de Certificado de Licitud de Título (5552). Número de Certificado de Licitud de Contenido (4295). Número de Reserva al Título de Derechos de Autor (648-91). Distribuido por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Impreso en los Talleres de la Facultad de Medicina de la UNAM.

ÍNDICE

EDITORIAL	VII
AGRADECIMIENTOS	IX
PROGRAMA	X
DR. FÉLIX CÓRDOBA ALVA, <i>IN MEMORIAM</i>	XV
S. Almeida, S. Correia, R. Nascimento, V. Oliveira, AL. Y Reis RME Parkhouse INTERACCIÓN PATÓGENO-HUÉSPED: UN ARMA DE DOBLE FILO	1
Norma Lucila Ramírez López EL APRENDIZAJE BASADO EN PROBLEMAS EN EL DESARROLLO Y ADQUISICIÓN DE COMPETENCIAS EN CIENCIAS DE LA SALUD	19
Eduardo Rial y María del Mar González-Barroso LA PROTEÍNA DESACOPLANTE UCP1 DEL TEJIDO ADIPOSO CAFÉ: MECANISMO, ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y REGULACIÓN	30
José Antonio Lorente Acosta, María Lourdes Vega Navarrete y Gisele Olivia Rosas Solares GENÉTICA FORENSE. LA CIENCIA AL SERVICIO DE LA JUSTICIA	44
Linda Sarai Velázquez Coca EL PERFIL DE APRENDIZAJE Y LAS INTELIGENCIAS MÚLTIPLES	68
Patricia León y Arturo Guevara-García LA SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES A TRAVES DE LA VÍA MEP; UN NUEVO BLANCO DE MANIPULACIÓN PARA LA SALUD Y EL BENEFICIO HUMANO	77
Patricio Gariglio Vidal GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER CERVICOUTERINO EN ETAPAS MÚLTIPLES	92
Enrique Ortega, Claudia Hallal-Calleros y Paula Santoyo ACTIVACIÓN DE LEUCOCITOS A TRAVES DE RECEPTORES PARA INMUNOGLOBULINA G	114

César Pedroza Roldán, Claudia Charles-Niño y Karen Manoutcharian	131
LOS PROBLEMAS DE LAS VACUNAS CONTRA ENFERMEDADES Y PATÓGENOS ANTIGENICAMENTE VARIABLES	
Luis Felipe Jiménez García, Reyna Lara Martínez, Ivet Gil Chavarría, Alma Leticia Zamora Cura, Martha Salcedo Alvarez, Lourdes Teresa Agredano Moreno, José de Jesús Moncayo Sahagún, María de Lourdes Segura Valdez	141
BIOLOGÍA CELULAR DEL SPLICING	
Felipe Cruz García, Javier Andrés Juárez-Díaz, Yuridia Cruz González-Zamora, Grethel Y. Busot-González, Andrea Hernández-Navarro	157
SISTEMAS DE RECONOCIMIENTO CÉLULA-CÉLULA BASADOS EN S-RNASE QUE PROMUEVEN LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN LAS PLANTAS	
Alejandro Zentella Dehesa, Susana Frías, Gabriela Galicia Vázquez, Edgar Josué Ruiz Medina, Emilio Córdova Alarcón, José Luís Ventura Gallegos, Julio R Ramírez Velázquez, Noé Castro Sánchez, Delina G Montes Sánchez, María de Jesús Ibarra Sánchez	172
CÁNCER DE GLÁNDULA MAMARIA Y METÁSTASIS: UN CRECIENTE PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA EN MÉXICO	



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

EDITORIAL

Un aspecto fundamental en la labor de la investigación científica, además del empleo de sus productos en beneficio de nuestra sociedad, es la difusión de sus resultados en términos sencillos y precisos, para que éstos logren permear a través de nuestros grupos sociales. La información contenida en este libro, tiene como objetivo el mostrar el estado actual de distintas áreas de investigación biológica a nivel nacional e internacional, impactando en el conocimiento general de aquellos, que en el futuro, deberán tomar decisiones en salud, enseñanza y en la propia investigación del país. La divulgación de la ciencia requiere de la participación entusiasta de distintos personajes, como la de los investigadores de nivel nacional e internacional que redacten y expongan magistralmente sus conocimientos; un grupo de científicos que realicen una impecable revisión de los manuscritos y un grupo de editores cuya contribución permita llevar en tiempo y forma, la publicación de tales conocimientos. Como miembros de este último grupo, deseamos mencionar que el esfuerzo de coordinar integralmente a todos estos actores se recompensa generosamente, cuando los temas de investigación a presentar son de la más alta calidad y vanguardia. En ese sentido, el comité editorial agradece profundamente a los investigadores que contribuyeron a la realización de dos importantes foros de divulgación científica en nuestro país. El primero, la edición del volumen XXXI del "Mensaje Bioquímico", publicación con más de 30 años de tradición en albergar las revisiones científicas de mayor relevancia escritas en español. El segundo, el desarrollo del XXXIV "Taller de Actualización Bioquímica" el cual permite difundir y actualizar el conocimiento científico, bajo un marco de crítica constructiva y de discusión cordial.

La edición XXXI del "Mensaje Bioquímico" que publica el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, presenta las modificaciones que mejoraron su formato desde hace más de 5 años. Estas modificaciones incluyen una mayor calidad de papel y de las figuras a color, estas últimas con una alta resolución, lo que favorece al lector la extracción de una mayor información de las imágenes e ilustraciones. Además de la presencia de un resumen en español e inglés de cada capítulo, se incorpora una semblanza del autor principal, así como de sus direcciones postal y electrónicas; esto facilita la localización y comunicación de los lectores con los investigadores. El "Mensaje Bioquímico" es una publicación anual que se edita en papel y en edición electrónica (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico/>) para una mayor difusión de la obra dentro la comunidad de habla hispana. El "Mensaje Bioquímico" se encuentra registrado desde el 2005 por el índice de las Revistas Latinoamericanas en Ciencia PERIÓDICA, así como en las bases de datos de LATINDEX.

Creemos que la variedad del contenido de la edición número XXXI cumple con las exigencias actuales en diversidad de intereses que la comunidad bioquímica requiere. En esta ocasión se presenta una gama de trabajos que abarcan los diferentes niveles de interacciones biológicas, el empleo de la genética y la biología molecular para distintas áreas de la investigación y el estudio de la biosíntesis de moléculas orgánicas. Además, se incluyen temas sobre la estructura y función de proteínas, la aplicación de tecnología de punta en el estudio de la salud y de la utilización de técnicas modernas para el desarrollo del aprendizaje acelerado.

Las pláticas que involucran el estudio sobre los diferentes niveles de interacción celular, incluyen por un lado la participación del **Dr. Michael Parkhouse**, del Instituto Gulbenkian de Portugal, el cual nos presentará las interacciones que existen entre la relación del huésped con sus

patógenos, y como a partir de este conocimiento se logra la fabricación de vacunas para la prevención de enfermedades de origen viral; por otro lado el **Dr. Felipe Cruz García** de la Facultad de Química de la UNAM, nos expondrá los sistemas de reconocimiento moleculares entre célula-célula vinculados con la enzima S-RNasa y su relación con la promoción de diversidad genética en las plantas y por último, el **Dr. Enrique Ortega Soto** del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, nos mostrará los avances en los procesos de la activación de las células leucocitarias a través de la interacción de receptores con inmunoglobulinas G.

En lo que se refiere al área de la biosíntesis de moléculas orgánicas, la **Dra. Patricia León Mejía** del Instituto de Biotecnología de la UNAM, nos hablará de la síntesis de isoprenoides a través de la vía del metil-eritritol 4 fosfato (MEP), la cual se postula como un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano.

Las pláticas sobre el empleo de la genética para el desarrollo de terapias eficaces aplicadas a problemas de salud pública que afectan a un gran número de la población en nuestro país, estarán sustentadas por diversos investigadores. El **Dr. Benito Antón Palma** del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, nos llevará por el conocimiento a nivel molecular de las causas de la adicción a las drogas, tales como los opiáceos; el **Dr. Patricio Gariglio Vidal** del CINVESTAV del IPN, nos platicará sobre la serie de alteraciones que exhiben los genes implicados en el desarrollo del cáncer cervicouterino durante etapas múltiples; el **Dr. Alejandro Zentella Dehesa** del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán e Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, nos hablará sobre el cáncer de glándula mamaria y metástasis y el **Dr. Karen Manoutcharian** del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, tratará acerca de los problemas que la investigación deberá enfrentar para desarrollar vacunas contra enfermedades y patógenos antigénicamente variables.

Adentrándonos en el ámbito de la investigación básica dentro del rubro de estructura y los mecanismos que regulan la función de las proteínas, el **Dr. Luis Felipe Jiménez García** de la Facultad de Ciencias de la UNAM nos llevará a explorar la compleja maquinaria del proceso de maduración del RNA, conocido como splicing, durante distintos estadios celulares y el **Dr. Eduardo Rial Zueco** del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC de Madrid, España, nos llevará a explorar sobre el mecanismo, estructura, función y regulación de la proteína desacomplante UCP1 del tejido adiposo café.

Dentro de la sección del uso de tecnología de punta aplicada a la identificación de marcadores moleculares en el progreso de enfermedades, la plática del **Dr. Erick Alexánder Rosas** de la Facultad de Medicina de la UNAM, nos mostrará el potencial que presenta la aplicación del sistema PET y TAC multicorte 64 en problemas y soluciones cardiovasculares. Por otra parte, la **QFB Lourdes Vega Navarrete** del Centro de Estudios e Investigaciones Genéticas ANIGEN de México, nos llevará por los terrenos de la genética forense, y de su impacto sobre la conducción de la justicia.

En el área de apoyo a la docencia y educación continua a profesores contamos con la plática de la **Dra. Norma Lucila Ramírez López** de la Facultad de Medicina de la UNAM. La Dra. Ramírez nos explicará sobre el aprendizaje basado en problemas en el desarrollo y adquisición de competencias en ciencias de la salud. En este mismo orden de ideas, la **Lic. Linda Sarai Velázquez Coca** de la Facultad de Medicina de la UNAM, nos impartirá un taller sobre el perfil de aprendizaje y las inteligencias múltiples.

Estamos seguros que la celebración del XXXIV “Taller de Actualización Bioquímica” y de la XXXI edición del “Mensaje Bioquímico”, será un festín de conocimientos para la comunidad bioquímica hispano parlante. Deseamos que estos trabajos contribuyan a modificar de forma positiva, el pensamiento y la conducta de investigadores, profesores y estudiosos de la bioquímica.

Dr. Horacio Reyes Vivas
Junio 2007

AGRADECIMIENTOS

Para la edición e impresión del volumen XXXI de la Colección “Mensaje Bioquímico” y para la organización del ciclo de conferencias del XXXIV Taller de Actualización Bioquímica 2007, es indispensable la participación de los patrocinadores. Este trabajo recibió el apoyo del **Dr. José Narro Robles**, Director de la Facultad de Medicina y del **Dr. Edgar Zenteno Galindo**, Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Como ha sido durante años, recibimos el apoyo del **Dr. Antonio Caso**, Secretario Académico de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina de la UNAM, para la elaboración de las carpetas que se entregan a cada uno de los asistentes a este evento. También recibimos apoyo financiero del **Posgrado en Ciencias Biomédicas**, del **Posgrado en Ciencias Biológicas** y del **Posgrado en Ciencias Químicas** de la UNAM y de la **Sociedad Mexicana de Inmunología**.

En la Facultad de Medicina, agradecemos a la **Lic. Julieta Ambriz Laguna** y al personal de diseño gráfico a su cargo por el diseño de los carteles, trípticos y la portada del volumen XXXI del libro “Mensaje Bioquímico”, incluyendo por supuesto la impresión de los mismos y de todas las figuras a color del libro. Para la difusión del Taller tanto en la Gaceta de la Facultad de Medicina como en la Gaceta UNAM agradecemos a la **Sra. Martha Marín Zapata** jefa del Departamento de Informática y Prensa y a su equipo de trabajo A todo el personal de la imprenta por su compromiso con el trabajo, en especial al **CP Alfonso Aguirre Herrera** y a los **Sres. Félix Pacheco** y **Juan Carlos Macías**. Dentro del Departamento de Bioquímica queremos reconocer la labor de la **Lic. Ma. Elena Alfaro Camacho** y del personal administrativo, especialmente de las **Sras. Marivel Rojas García**, y **Rosa María López**, quienes de una u otra manera nos apoyaron en las diferentes etapas de la organización de este evento.

No quremos dejar de reconocer la labor de los revisores invitados, **Dr. Salvador Uribe Carvajal**, **Dra. Sobeida Sanchez**, **Dra. Dolores Correa**, **Dr. Gabriel López Velázquez**, **Dr. Juan Pablo Pardo**, **Dra. Ma. Cristina Castañeda Patlán**, **Dr. Raúl Chávez Sánchez** y **Dra. Berenice García Ponce de León**, quienes con sus opiniones mejoraron indiscutiblemente la calidad de los trabajos presentados:.

Por último, queremos agradecer también a la empresa **ACCESOLAB** y a la **Editorial Reverte** por su apoyo en en el servicio de café y galletas durante el evento.

XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina, UNAM

Auditorio Alfonso Caso, del 6 al 8 de agosto de 2007

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES
9:00-9:30 INAUGURACIÓN		
9:30-10:45 Dr. Michael Parkhouse Instituto Gulbenkian, Portugal <i>"Interacción Patógeno-Huésped Un arma de doble filo"</i>	9:30-10:45 Dr. Alejandro Zentella Dehesa Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM <i>"Cáncer de glándula mamaria y metástasis: Un creciente problema de salud pública en México"</i>	9:30-10:45 Dra. Patricia León Mejía Instituto de Biotecnología, UNAM <i>"La síntesis de isoprenoides a través de la vía MEP; un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano"</i>
10:45-11:10 RECESO	10:45-11:10 RECESO	10:45-11:10 RECESO
11:10-12:25 Dr. Felipe Cruz García Facultad de Química, UNAM. <i>"Sistemas de reconocimiento célula-célula basados en S- RNasa que promueven la diversidad genética en las plantas"</i>	11:10-12:25 Dr. Eduardo Rial Zueco Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España <i>"La proteína desacoplante UCP1 del tejido adiposo café: mecanismo, estructura, función y regulación"</i>	11:10-12:25 Dr. Patricio Gariglio Vidal CINVESTAV, IPN <i>"Genes implicados en el desarrollo del cáncer cervicouterino en etapas múltiples"</i>
12:25-13:40 Dr. Benito Antón Palma Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" <i>"Neurobiología molecular de las adicciones"</i>	12:25-13:40 Dr. Luis Felipe Jiménez García Facultad de Ciencias, UNAM <i>"Biología celular del splicing"</i>	12:25-13:40 Dr. Karen Manoutcharian Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM <i>"Los problemas de las vacunas contra enfermedades y patógenos antigénicamente variables"</i>
14:00-16:00 COMIDA	14:00-16:00 COMIDA	14:00-16:00 COMIDA
16:00-17:15 Dr. Erick Alexánderson Rosas Facultad de Medicina, UNAM <i>"Aplicaciones cardiovasculares del PET y TAC multicorte 64"</i>	16:00-17:15 QFB. Lourdes Vega Navarrete Centro de Estudios e Investigaciones Genéticas, ANIGEN, México <i>"Genética forense: La ciencia al servicio de la justicia"</i>	16:00-17:15 Dr. Enrique Ortega Soto Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM <i>"Activación de leucocitos a través de receptores para inmunoglobulina G"</i>
17:15-18:45 Dra. Norma Ramírez López Facultad de Medicina, UNAM <i>"El aprendizaje basado en problemas en el desarrollo y adquisición de competencias en ciencias de la salud"</i>	17:15-18:45 Lic. Linda Sarai Velázquez Coca Facultad de Medicina, UNAM <i>"El perfil de aprendizaje y las inteligencias múltiples"</i>	17:15-18:45 Lic. Linda Sarai Velázquez Coca Facultad de Medicina, UNAM <i>"El perfil de aprendizaje y las inteligencias múltiples"</i>

XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina, UNAM

Auditorio Alfonso Caso, del 6 al 8 de agosto de 2007

LUNES

8:30 hrs Registro e Inscripciones

9:00 hrs Inauguración. **Dr. José Narro Robles**. Director de la Facultad de Medicina, UNAM.

9:15 hrs Presentación. Dr. Edgar Zenteno Galindo. Jefe del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Conferencias:

9:30-10:45

Dr. Michael Parkhouse

Instituto Gulbenkian, Portugal

“Interacción Patógeno-Huésped: Un arma de doble filo”

11:10-12:25

Dr. Felipe Cruz García

Facultad de Química, UNAM.

“Sistemas de reconocimiento célula-célula basados en S-RNasa que promueven la diversidad genética en las plantas”

12:25-13:40

Dr. Benito Antón Palma

Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”

“Neurobiología molecular de las adicciones”

16:00-17:15

Dr. Erick Alexánder Rosas

Facultad de Medicina, UNAM

“Aplicaciones cardiovasculares del PET y TAC multicorte 64”

17:15-18:45

Dra. Norma Lucila Ramírez López

Facultad de Medicina, UNAM

“El aprendizaje basado en problemas en el desarrollo y adquisición de competencias en ciencias de la salud”

XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina, UNAM

Auditorio Alfonso Caso, del 6 al 8 de agosto de 2007

MARTES

9:30-10:45

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

"Cáncer de glándula mamaria y metástasis: Un creciente problema de salud pública en México"

11:10-12:25

Dr. Eduardo Rial Zueco

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España

"La proteína desacoplante UCP1 del tejido adiposo café: mecanismo, estructura, función y regulación"

12:25-13:40

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Facultad de Ciencias, UNAM

"Biología celular del splicing"

16:00-17:15

QFB. Lourdes Vega Navarrete

Centro de Estudios e Investigaciones Genéticas, ANIGEN, México

"Genética forense: La ciencia al servicio de la justicia"

17:15-18:45

Lic. Linda Sarai Velázquez Coca

Facultad de Medicina, UNAM

"El perfil de aprendizaje y las inteligencias múltiples"

XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina, UNAM

Auditorio Alfonso Caso, del 6 al 8 de agosto de 2007

MIÉRCOLES

9:30-10:45

Dra. Patricia León Mejía

Instituto de Biotecnología, UNAM

“La síntesis de isoprenoides a través de la vía MEP; un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano”

11:10-12:25

Dr. Patricio Gariglio Vidal

CINVESTAV, IPN

“Genes implicados en el desarrollo del cáncer cervicouterino en etapas múltiples”

12:25-13:40

Dr. Karen Manoutcharian

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

“Los problemas de las vacunas contra enfermedades y patógenos antigénicamente variables”

16:00-17:15

Dr. Enrique Ortega Soto

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

“Activación de leucocitos a través de receptores para inmunoglobulina G”

17:15-18:45

Lic. Linda Sarai Velázquez Coca

Facultad de Medicina, UNAM

“El perfil de aprendizaje y las inteligencias múltiples”

XXXIII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Auditorio Alfonso Caso, del 6 al 8 de agosto de 2007

Comité organizador

Jesús Oria Hernández
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
joria@bq.unam.mx

Erika Rendón Huerta
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
erendon@bq.unam.mx

Horacio Reyes Vivas
Departamento de Bioquímica-Genética
Instituto Nacional de Pediatría
hreyesvivas@yahoo.com.mx

Irma Romero Álvarez
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
irma@bq.unam.mx

Isabel Velázquez López
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
Isavel@bq.unam.mx



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

Dr. Félix Córdoba Alva

In memoriam

Eduardo Pérez Campos¹, Juan Molina Guarneros² y Edgar Zenteno Galindo³

Facultad de Medicina Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca¹
Departamentos de Farmacología² y de Bioquímica³, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México.



Originario de la Ciudad de México (25 de Febrero de 1926), realizó sus estudios de Primaria, Secundaria y Preparatoria en el Colegio Cristóbal Colón (México D. F.). Realizó la carrera de Médico Cirujano en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México en el período 1946 a 1951. En sus estudios de posgrado realizó la especialidad de Laboratorista (1953 y 1954) también en la Facultad de Medicina, su trabajo estaba relacionado con la bioquímica de esteroides y su relación con diversos microorganismos, en esa época obtiene una plaza de Microbiólogo en Syntex S.A. (1951-1954) y publica en esa época sus dos primeros trabajos en colaboración con los Doctores Rubin; Casas-Campillo, Arreguín y Zaffaroni: "The utilization of steroidal sapognins by microorganisms" y "Oxidations of steroids in position 21 by microorganisms", en la revista *Bacteriology Proceedings* en 1953 y 1956.

Formalmente inició sus estudios en Inmunoquímica en el Laboratorio del eminente Profesor Michael Heildeberg en la Universidad de Columbia, Nueva York (1954 –1955), donde realizó un proyecto dirigido a identificar la actividad antigénica de polisacáridos bacterianos y publicó los trabajos "Cross-reactions of anti-thyphoid and ant-paratyphoid B horse sera with various polysaccharides"; "Cross-reactions of polyglucose in antipneumococcal sera. Precipitation in rabbit antisera to type IX and type XII Pnemococcus", así como "Recientes contribuciones inmunoquímicas al estudio de polisacáridos", en las revistas *Journal of Experimental Medicine* (1956), *Journal of Immunology* (1957) y *Ciencia*, (México,1959), respectivamente. Obtuvo el grado de Doctor en Bioquímica (*Cum laude*) en 1972, en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, su asesor fue el Dr. Edmundo Calva y su trabajo estuvo relacionado con estudios inmunoquímicos utilizando al fosfato de piridoxal y las transaminasas glutámico pirúvica y oxaloacética como modelo. Este trabajo marca un avance interesante en la inmunología ya que hasta ese momento se estudiaban las características inmunogénicas de moléculas de gran tamaño sin considerar que la interacción de un anticuerpo dirigido contra un cofactor podría modificar la función de una enzima. Los resultados de su trabajo fueron publicados en *Nature* (1962); la *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM* (1962); la *Gaceta Médica de México* (1963), y *Biochemical and Biophysics Research Communications* (1963).

Realizó estancias de investigación en la Universidad de Boston en 1956-1957, en la Universidad de California (Southern California 1962-1963), fue también Investigador Asociado en la Universidad de Puerto Rico 1967-1968 y realizó una estancia posdoctoral en el Instituto Gamaleya, Moscú, en la antigua Unión Soviética en 1972.

Actividad docente

Su actividad como docente en la Facultad de Medicina la inició como Profesor de Tiempo Completo B en la Facultad de Medicina en 1957; en 1962 obtuvo la plaza de Profesor de Tiempo Completo C. Entre 1971 y 1973 fue Jefe de la División de Investigación de la Facultad de Medicina. En 1970 fundó la Unidad de Biología Experimental, en el sexto piso del edificio A de la Facultad, donde se fundó posteriormente el Departamento de Medicina Experimental, y fue Jefe del mismo hasta 1975. Ese año inicia el trabajo pionero de crear una Institución de investigación fuera de la Ciudad de México y en colaboración con el Consejo Nacional de Tecnología y el Gobierno del Estado de Baja California Sur fundó el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Baja California Sur en La Paz, B.C.S., donde fue Director General hasta 1984. Posteriormente se mudó a la Ciudad de Oaxaca, donde fundó en 1985 el Centro de Investigaciones Biológicas en la Universidad de la Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, (CIB-UABJO) donde fue Director hasta 1986. Fue Investigador Invitado en el Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno UNAM de 1987 hasta 1993 y posteriormente se desempeñó como Coordinador Académico de la Unidad de Bioquímica e Inmunología (UBIN) del Instituto Tecnológico de Oaxaca-UNAM desde que la fundó en 1985.

El Dr. Córdoba fue Profesor Titular de la cátedra de Bioquímica en las Facultades de Medicina y Química de la UNAM desde 1962 hasta 1975, impartió también cursos de Inmunología en el Posgrado de la Facultad de Medicina de la UNAM (1963-1975) y de la Escuela de Ciencias Biológicas-IPN (1969-1974). Se desempeñó como Profesor Invitado de Bioquímica en el Instituto Mexicano del Seguro Social (1973-1974), en el Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S; La Paz, B.C.S (1975-1984), en el Centro de Investigaciones Biológicas de la UABJO Oaxaca,(1975-1976) y en el Instituto Tecnológico de Oaxaca. Los cursos optativos de Inmunología para estudiantes de Medicina, creados en 1974 por el Dr. Córdoba fueron continuados por sus alumnos como Concepción Agundis, Roger Carvajal, y Salvador Martínez-Cairo, y sentaron las bases para la actual asignatura de Inmunología en el programa de la Carrera de Médico Cirujano aprobada en 1994.

Distinciones

El Dr. Córdoba formó parte de diversas sociedades científicas algunas de las cuales fue miembro fundador y posteriormente presidió, como la Academia Mexicana de Ciencias, la Sociedad Mexicana de Inmunología, la Sociedad Mexicana para el estudio de los Mamíferos Marinos, el Colegio de Oaxaca A.C. También fue miembro de Academia Nacional de Medicina, la Sociedad Mexicana de Bioquímica, la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, y de diversas Sociedades Científicas internacionales como la Sociedad SIGMA XI (USA), la American Association for the Advancement of Science (USA), Pacific Science Association (Internacional), Agricultural Chemical Society of Japan y Asociación Interciencia (Caracas, Venezuela).

Recibió el Premio Carnot de la Academia Nacional de Medicina (1970), la Medalla al Mérito Científico otorgada por el Club de Rotarios de México (1971), el premio de Investigación Científica de la Cámara de la Industria Farmacéutica (1972), el Reconocimiento al Mérito en Investigación Ciencia y Tecnología 1994 por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como una Cátedra Patrimonial Nivel II (1994). Fue miembro desde su creación del Sistema Nacional de Investigadores en el Nivel III y distinguido con el PRIDE D en la Universidad Nacional Autónoma de México. Le fue otorgada la Cátedra Salvador Zubirán Anchondo en la Facultad de Medicina, UNAM

en 1998. El Consejo Universitario de la UNAM, le otorgó la medalla “Justo Sierra” al mérito universitario en noviembre de 2004.

Producción científica

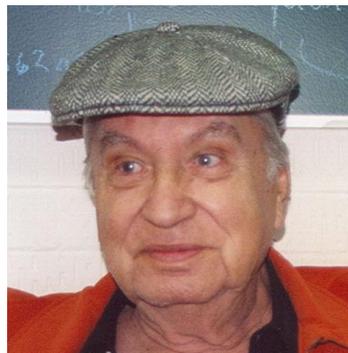
El Dr. Córdoba publicó 75 artículos con los resultados de sus investigaciones. Es interesante identificar que en la parte inicial de su carrera haya publicado al lado de eminentes investigadores Nacionales e Internacionales como los Dres. Arreguín, Casas-Campillo, Rosenkranz, Heidelberger y Estrada; sin embargo su primera publicación en la prestigiada revista Nature (1962) lo hace con trabajo realizado integralmente en la Facultad de Medicina, publica dos trabajos mas en esa revista en 1963 y 1964. A principio de la década de los años '70 el Dr. Córdoba inició el estudio de la regulación de la respuesta inmune utilizando lectinas, publicando trabajos relevantes en ese tema desde 1975, en colaboración con Raquel Calderón, hasta el final de su carrera en trabajos firmados con sus últimos alumnos de doctorado como Margarito Martínez (ITO-Oaxaca), Eduardo Pérez Campos (UABJO, Oaxaca) y Juan Molina (UNAM). Realizó además 121 presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales. En su actividad editorial realizó dos libros monográficos sobre los fundamentos de Inmunología e Inmunología, editada por la Organización de los Estados Americanos (1973 y 2003) así como 14 capítulos en libros nacionales e internacionales en su especialidad. Publicó diez trabajos de difusión y diversos artículos en periódicos.

Formación de Recursos Humanos

El Dr. Félix Córdoba, representó sin duda una importante alternativa para el desarrollo de ideas, el ejercicio dialéctico fue la característica más importante que trataba de inducir en todos sus alumnos, no importaba en que área, ciencia, cultura, o política. Es quizá en el Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, en la Paz Baja California donde logró desarrollar su capacidad para crear áreas científicas como la biotecnología, la biología marina, la biología terrestre, la antropología, así como la generación de foros de expresión de diversas áreas, tal como el Boletín del CIB, donde se publicaron resultados de investigación científica, ensayos, cuentos o dibujos. Formalmente dirigió y graduó 25 Tesis de Licenciatura, 6 tesis de Maestría y 6 tesis de doctorado: Roger Carvajal (1965), Eduardo Pérez-Campos (1996), Leonardo Vásquez y Margarito Martínez Cruz (1999) Alma Dolores Pérez Santiago (2003) y Juan Molina (2006). Generó además dos programas de Doctorado en el Instituto Regional de Oaxaca y otro en la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. El aspecto más relevante en la Carrera Científica del Dr Córdoba fue, sin duda, el apoyo a la formación de un gran número de científicos de gran relevancia en el desarrollo de la Ciencia en nuestro país.

Durante los últimos tres años de su vida, realizó una comisión de la UNAM, para desarrollar estudios de bioquímica vegetal en especies de plantas propias de esa región, en el hoy Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), que el había fundado, así como en la organización de un programa Doctorado en la UABCS, cuando el 25 de enero del 2007, cesó para siempre su incansable labor científica.

Promotor de la Inmunología en México, difusor excelso de la vasta labor de investigación que se realiza en la UNAM, garante de la universalidad de la Facultad de Medicina y de la Universidad Nacional Autónoma de México.





Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

INTERACCION HUESPED-PATÓGENO: UNA ARMA DE DOBLE FILO

S. Almeida, S. Correia, R. Nascimento, V. Oliveira, AL. y Reis RME Parkhouse*
Instituto Gulbenkian de Ciencia. Rua de Quinta Grande No. 6, 271-901 Oeiras.
Tel: 21 4464615, FAX: 21 4407970.
*parkous@igc.gulbenkian.pt

Resumen

Nuestro trabajo inicia con la premisa de que los virus de DNA grande, habiendo evolucionado junto con sus hospederos durante años, han desarrollado un repertorio complejo de mecanismos para manipular la biología de las células del hospedero y las respuestas inmunes. El estudio de éstos puede proporcionar estrategias valiosas para el control de los virus, abordajes únicos para el tratamiento de enfermedades no-infecciosas, tales como el cáncer y la inflamación, así como herramientas apropiadas para la manipulación y terapia génica. Aunque la mayoría de los genes que han evolucionados para la evasión/adaptación en el hospedero han sido previamente descubiertos mediante su homología con proteínas existentes, ahora está claro que los virus de DNA han desarrollado genes de "evasión" sin ninguna homología en la base de datos. Nosotros tenemos la hipótesis de que muchos de los genes no-homólogos y no-asignados de los virus de DNA (20-40% del genoma) deben haber evolucionado para manipular al hospedero. Éstos sólo pueden identificarse mediante ensayos funcionales y, como se describe más adelante, se confirmó que los genes de dos virus de DNA muy diferentes, el virus de la Fiebre Porcina Africana y el virus del herpes, tienen estrategias que han evolucionado para manipular al hospedero. Específicamente, hemos identificado nuevas estrategias virales para inhibir la respuesta mediada por el IFN, una que inhibe la señalización del receptor de TLR y otra que manipula la división celular. Uno de estos dos últimos genes, que induce arresto del ciclo celular seguido de muerte celular por apoptosis, puede contribuir a la patogénesis de las infecciones por el virus del herpes y puede ser también de utilidad en la terapia de cáncer, en presencia de un sistema apropiado y específico, tal como los liposomas que contengan anticuerpos contra el gen viral inductor de la apoptosis.

Adicionalmente, la eliminación de genes utilizados para la evasión en el hospedero, puesto que pueden conferir una ventaja al virus, proporciona una estrategia racional para la construcción de vacunas a base de virus vivos atenuados que carezcan de estos genes; entre ellos, por ejemplo, están los virus del herpes y el patógeno de la Fiebre Porcina Africano, tan importante en veterinaria.

Finalmente, hemos explorado el concepto de moléculas de evasión del virus como herramientas puntuales para la manipulación y la terapia génica mediante la construcción de ratones transgénicos que expresan en linfocitos T un gen viral que inhibe la activación de los factores de transcripción NFκB y el NFAT. Estos ratones desarrollaron un tumor de células T transplantable, angiogénico y metastásico, semejante a las leucemias linfoblásticas agudas de células T y, por tanto, un modelo para estudiar esta leucemia.

Palabras clave: Virus con DNA grande, respuesta inmune, evasión molecular, manipulación y terapia génica.

Abstract

Our work starts with the premise that large DNA viruses, having evolved together with their hosts for millions of years, have developed a sophisticated repertoire of mechanisms for the manipulation of host cell biology and immune responses. The study of these can provide valuable strategies for control of viruses, unique approaches for treatment of non-infectious diseases, such as cancer and inflammation, and “ready made tools” for gene therapy/manipulation.

Although most virus genes evolved for host evasion/adaptation have previously been discovered through their homology with existing proteins, it is now clear that DNA viruses have evolved host “evasion” genes without any homology in the database. We have hypothesised that many of the non-homologous and non-assigned genes of DNA viruses (20-40% of the genome) will have evolved for host manipulation. These can only be identified through functional assays and, as described below, we have confirmed that non-homologous, non-assigned DNA virus genes of two very different DNA viruses (African 2 Swine Fever Virus and herpesviruses) do include strategies that have evolved for host cell manipulation.

Specifically, we have identified three novel virus strategies for inhibition of the IFN responses, one for inhibition of Toll-receptor like signalling and two which manipulate cell division. One of the latter two genes, which induces cell cycle arrest followed by apoptotic cell death, may contribute to the pathogenesis of herpesvirus infections and may also have utility in cancer therapy, given an appropriate and specific delivery system, such as antibody directed liposomes of the apoptosis inducing virus gene.

In addition, deletion of host evasion genes, as they may confer an advantage to the virus, provides a rational strategy towards the construction of attenuated, live virus gene deletion mutant vaccines, for us, for example, herpesviruses and the important veterinary pathogen African Swine Fever.

Finally, we have explored the concept of virus host evasion molecules as “ready made tools” for gene therapy/manipulation by construction of T-lymphocyte restricted transgenic mice expressing a virus gene inhibiting activation of the transcription factors NFκB and NFAT.

These mice developed a metastasing, angiogenic and transplantable T cell tumour, reminiscent of T cell acute lymphoblastic leukaemias, and thus a model to study this leukaemia.

Keywords: Large DNA viruses, immune response, molecular evasion, gene therapy/manipulation.

Introducción

Los virus de DNA grande, tales como el herpes, pox y el virus de la Fiebre Porcina Africana (ASFV, por sus siglas en inglés), tienen genes y estrategias múltiples para la modulación positiva y negativa de la biología de las células y de las respuestas inmunes en el hospedero [1-4]. Su eliminación proporciona una estrategia racional y general para la construcción de vacunas de virus vivos atenuados. Adicionalmente, el entender cómo los virus

manipulan el ciclo celular del hospedero, la apoptosis y las respuestas inflamatorias puede ayudar a comprender y tratar la progresión neoplásica y dar origen a terapias nuevas para las enfermedades inflamatorias, como la artritis. En los últimos años mediante la secuenciación del genoma viral y las búsquedas subsecuentes en la base de datos se han identificado virus modificadores de la apoptosis y de las respuestas de las citocinas. Sin embargo, hoy en día cada vez es más clara la existencia de moléculas de evasión a las que no se les había asignado una función y que no tienen contrapartes celulares estructuralmente homólogas.

De acuerdo a lo anterior, un aspecto original del presente trabajo es, por tanto, la identificación de nuevos genes virales de evasión por medio de ensayos funcionales diseñados para evaluar su impacto en la inducción y la manipulación de la progresión del ciclo celular, de la apoptosis y de las respuestas mediadas por el interferón y el receptor TLR (del inglés *Toll like Receptor*, receptores de membrana tipo 1 presentes en los fagocitos). Dichos genes son utilizados como herramientas para la manipulación de la biología de las células y de las respuestas inmunes en el hospedero y, como tales, pueden tener utilidad práctica en el desarrollo de nuevos fármacos. Por ejemplo, los genes virales que retrasan el inicio de la apoptosis son candidatos para el desarrollo de linajes celulares de larga vida, para la fermentación biotecnológica, y aquellos que inducen apoptosis pueden ser promisorios para la terapia del cáncer.

Los genes que se escogieron para el proyecto se seleccionaron de los genomas de dos virus muy diferentes, el virus de la Fiebre Porcina Africana (ASFV) y el virus del herpes de ratón (MHV-68). Nuestra estrategia consistió en clonar genes no-homólogos, sin función asignada, del ASFV y del MHV-68 y probar su impacto en la progresión del ciclo celular y la apoptosis y en las respuestas mediadas por interferón y el receptor TLR. En caso de una identificación positiva con el MHV-68, extender el trabajo a los genes homólogos, pero “no asignados” de los virus de herpes humano.

El virus de la Fiebre Porcina Africana (ASFV) produce una enfermedad letal en los cerdos por lo que es de gran relevancia económica y fue importado por primera vez a Europa en la ciudad de Lisboa. Con la creciente urbanización y consumo de carne de cerdo, el ASFV se está extendiendo en forma alarmante en África, donde representa una amenaza a la cadena alimenticia humana, así como una amenaza constante a la industria europea de carne de porcino. Hasta ahora no existe vacuna alguna. En principio, la eliminación de los genes que favorecen al virus en su hospedero mamífero proporciona una estrategia factible para el desarrollo racional de una vacuna con virus vivos atenuados. Entonces, ¿qué sugiere el genoma y el estilo de vida del ASFV?. En comparación con los virus pox, que comparten un ciclo replicativo similar con el ASFV, se estima que aproximadamente 60 genes del ASFV codifican proteínas no esenciales y, como se han identificado la mayoría de los genes que codifican proteínas estructurales y enzimas involucradas en la replicación, muchos de estos 60 genes “no asignados” deben haber evolucionado para afrontar las estrategias de evasión del hospedero. De particular interés para el desarrollo de una vacuna para el ASFV atenuada son aquellos genes que codifican las proteínas involucradas en la evasión inmune y/o en la virulencia viral. El ASFV infecta a los macrófagos, que son células que no se dividen y que al estimularse secretan citocinas pro-inflamatorias. De hecho, el macrófago es una verdadera fábrica del sistema inmune innato, equipado con una variedad de respuestas inmediatas a través de sus múltiples TLRs, de tal manera que es probable que el virus haya desarrollado estrategias para manipular dichas respuestas inmunes innatas. Como los macrófagos no se dividen y no tienen una reserva intracelular de desoxirribonucleótidos, es de esperarse que el virus tuviese impacto en la regulación de la división de la célula hospedera; por ejemplo en este caso, para estimular la síntesis de los desoxirribonucleótidos necesarios. A la fecha, hemos identificado un gen del ASFV que inhibe las respuestas del interferón, otro que tiene la propiedad dual de inhibir el interferón y de superar el arresto del ciclo celular G₀/G₁, y un tercero que inhibe las respuestas a los TLRs. Estos son candidatos para ser eliminados del genoma del virus y construir una vacuna con virus vivos que carezcan del gen.

Los virus del herpes son patógenos de humanos y animales importantes y ubicuos con una persistencia de por vida después de la infección. Dentro de estos se encuentran los virus del herpes tipo α responsables de las úlceras orales y genitales, los tipo β que causan mononucleosis humana, los virus que causan una patología severa en individuos inmunocomprometidos (SIDA o pacientes transplantados), y los virus que se asocian a la formación de tumores como el linfoma de Burkitt y el sarcoma de Kaposi. A pesar de su importancia, todavía no existe alguna vacuna contra ninguno de estos. Por otro lado, estos virus han evolucionado con sus hospederos y de acuerdo a sus estilos de vida; sus genomas contienen una amplia gama de genes para evadir y manipular la biología de las células en el hospedero y su inmunidad. Como se mencionó, la eliminación de los genes virales de evasión representa una estrategia racional para la construcción de vacunas de virus atenuados. Se ha identificado un buen número de genes de evasión del virus del herpes mediante técnicas de bioinformática, pero muchos de los genes del virus del herpes no tienen homólogos en mamíferos [5,6] y, de hecho, este grupo incluye genes que han evolucionado para la evasión en el hospedero. Estos genes sin función asignada, no-homólogos, son una fuente potencial de estrategias nuevas para vacunas y para la manipulación de células hospederas. Asimismo, los genes no-asignados, no-homólogos del virus del herpes que se han conservado en los virus α , β y γ en humanos ofrecen un interés particular puesto que su conservación sugiere un papel biológico esencial. Estos genes constituyen el principal objetivo de nuestro trabajo, en particular el gen UL24 tanto de ratón como de humano, el cual hemos demostrado que inducen arresto del ciclo celular del hospedero y de la apoptosis y, por tanto, es muy probable que juegue junto con otros genes, un papel crítico en la patogénesis de las infecciones por virus del herpes. Además, identificamos otro gen en los virus del herpes, con las mismas características que el UL24, que inhibe las respuestas del interferón. Estos dos genes son candidatos a ser eliminados para construir una vacuna de virus vivos mutados que carezcan de un gen.

Finalmente, como los virus han co-evolucionado con sus hospederos por muchos años (200 millones en el caso de los virus del herpes), las moléculas de evasión que tienen los virus constituyen una herramienta puntual para la terapia génica y la manipulación de la biología de la célula y las respuestas inmunes. Como un modelo de ello, hemos desarrollado un ratón transgénico cuyos linfocitos T expresan selectivamente un gen de evasión del ASFV que inhibe la activación de los factores de transcripción NF- κ B y NFAT. Este ratón proporciona un modelo de leucemia linfoblástica aguda de células T puesto que desarrolla un tumor en el timo metastásico, angiogénico y transplantable.

Estrategias experimentales abordadas en este estudio

Con el fin de identificar moléculas virales de evasión nuevas, las secuencias virales “no-asignadas” seleccionadas del ASFV y del MHV-68 se clonaron en vectores de expresión como pcDNA3 y el vector retroviral pLXIN IRES-GFP mediante PCR y se seleccionaron los transfectantes estables de retrovirus de acuerdo a lo descrito [7,8]. Los vectores retrovirales son altamente eficientes para transfectar genes extraños en las células, permitiendo el estudio del impacto del gen viral transfectado en ensayos funcionales. La proteína verde fluorescente (GFP) incorporada al vector permite la identificación fácil de las células transfectadas. Además, los vectores también incluyen una secuencia que codifica para un péptido inmunogénico de la hemaglutinina de la influenza (péptido HA), el cual permite la inmuno-identificación de la proteína viral expresada.

El efecto de la expresión de los genes virales “no-asignados” sobre la inducción de la progresión del ciclo celular se evaluó investigando la entrada de los fibroblastos de ratón a la fase G1 comparado con células retrovirales recombinantes transfectadas en un medio sin suero, bloqueadas en G₀. El análisis del ciclo celular se realizó mediante la tinción del DNA nuclear con yoduro de propidio, y análisis por densitometría de flujo (FACS). Un ensayo adicional consistió

en la formación de colonias en agar suave, utilizando células HeLa y PD 9 40B como controles positivos y negativos, respectivamente.

Para determinar los efectos en los mecanismos de apoptosis, los fibroblastos fueron infectados con retrovirus recombinantes y se midió su efecto sobre la apoptosis estimulada por el TNF (Factor de Necrosis Tumoral). La apoptosis de células transfectadas, en la presencia de una gama de concentraciones del TNF, se determinó por densitometría de flujo después de teñir con anexina o yoduro de propidio. Puesto que los retrovirus recombinantes también codifican para la GFP, el análisis de FACS selecciona las transfectantes retrovirales verdaderas, y la tinción con yoduro de propidio o con anexina acoplada a ficoeritrina permite hacer un análisis directo de la cinética de entrada en apoptosis de las células control y de las experimentales transfectadas con retrovirus. Finalmente, el impacto del gen viral transfectado en la inducción de la apoptosis en los fibroblastos de ratón se evaluó mediante la técnica de Tunnel (que marca los fragmentos de DNA, productos de la degradación, que están presentes hacia el final de la apoptosis) así como por la medición de los niveles de la actividad de caspasa-3 en células NIH inducida con H₂O₂ y el TNF.

Se diseñó una estrategia para identificar genes virales nuevos que inhiban las respuestas del interferón (IFN) cubriendo una amplia gama de posibilidades y enfocándose en la actividad de señales de iniciación y de factores de transcripción variables en la fase terminal de la inducción de interferón. Este es un enfoque que proporciona una identificación completa, puesto que puede ocurrir modulación viral de la respuesta del interferón en cualquier etapa de las complejas vías de transducción de señales que controlan la respuesta. En su descripción más simple, las células Vero, transfectadas con los ORF para genes "no-asignados" de retrovirus recombinantes, fueron tratadas con inductores de IFN y el impacto en las vías de transducción de señales inducidas por éste, fue evaluado mediante pruebas con el gen reportero que codifica para la luciferasa, proporcionado por el Dr. S. Goodbourn, del Departamento de Bioquímica e Inmunología, St. George's Hospital Medical School, Londres, Reino Unido. La inducción de respuestas de tipo interferón en células Vero se estimuló con RNA de doble cadena y con IFN y la lectura final, a nivel de varios factores de transcripción, se monitoreó mediante pruebas de gen reportero de la luciferasa (Fig. 1, cuadro 1).

Para estudiar los genes virales en cuanto a su impacto sobre las respuestas de los TLR, se transfectaron células 293T con los TLRs o con los CD4-TLRs constitutivamente activos. Las respuestas estudiadas se midieron con la actividad de luciferasa

Para determinar la localización subcelular de las proteínas virales clonadas, las células transfectadas se tiñeron con el anticuerpo anti-HA y con anticuerpos específicos para estructuras subcelulares como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico. La localización de una proteína viral proporciona indicios útiles respecto a su posible función. Para construir los ratones transgénicos con linfocitos T conteniendo el gen viral restringido, se clonó el gen viral en el plásmido SVA, bajo el control de la región promotora y del control de sitio del gene humano CD2 [9].

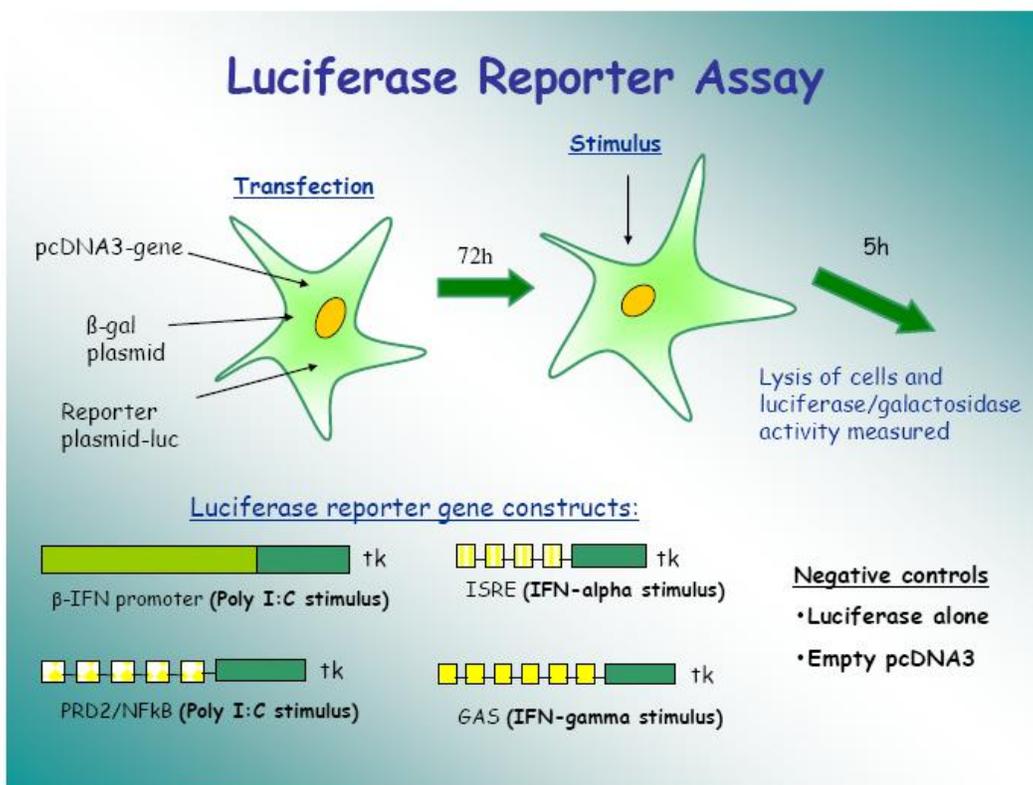


Figura 1. Esquema de los ensayos con el gen reportero de la luciferasa utilizado para detectar genes virales clonados que manipulan las respuestas del interferón.

Cuadro 1. Resumen de los ensayos con el gen reportero de la luciferasa para la detección de genes virales clonados que regulan las respuestas del interferón.

Stim	Trans. Factor	Elements	Response
Poly I:C	IRF3, NFkB, ATF2	PRD1-2-3-4	IFN-β gene
PMA	NFkB	PRD2	PMA stim. genes
IFN-α	IRF1 or ISGF3	ISRE	IFN I stim. genes
IFN-γ	GAF	GAS	IFN II stim. genes

Resultados

Búsqueda de nuevos genes de evasión del ASFV como candidatos para construir una vacuna mutante atenuada por la eliminación del gen.

Debido a la complejidad de la respuesta inmune porcina con sus múltiples blancos antigénicos que interactúan con los mecanismos de inmunidad tanto celular como humoral, se sugiere la construcción de una vacuna para el ASFV con virus “discapacitados”. Los múltiples mecanismos de evasión que posee el virus, mediante los cuales manipula la biología de las células y las respuestas inmunes innatas y adquiridas, proporcionan, candidatos lógicos para el diseño de vacunas con virus vivos atenuados mutados por eliminación de un gen. Se pueden identificar genes virales candidatos mediante homología secuencial, sin embargo, ahora está claro que los virus han desarrollado genes de evasión sin homología conocida. En ausencia de homología secuencial, los genes de evasión sólo podrán ser identificados mediante ensayos funcionales. Como ya se identificó a la mayoría de los genes del ASFV que codifican proteínas estructurales y enzimas, pensamos que una gran proporción de los genes “no asignados”, no-homólogos hayan evolucionado para manipular al hospedero y, de hecho, en este trabajo hemos identificado tres genes nuevos del ASFV que participan en cuatro mecanismos de evasión en el hospedero: dos inhiben las respuestas del interferón, uno impacta en la división celular y uno inhibe la señalización de los TLR.

El impacto de un gen viral sobre la progresión del ciclo celular se estudió mediante la tinción de DNA con yoduro de propidio y el análisis subsecuente de FACS.

Dos genes del ASFV que inhiben las respuestas IFN

La activación del sistema de interferón provocada por los virus, es uno de los principales componentes de la inmunidad innata temprana a la infección viral. Sirve para activar la resistencia mediada por el interferón dentro de la célula infectada así como para estimular su secreción por la misma célula infectada. Este último se difunde en el área local y “alerta” a las células cercanas sobre la presencia de un virus y éstas, a su vez, activan sus sistemas de defensa y pueden así enfrentar más eficientemente la acción viral. Existen dos sistemas diferenciados de interferón. Interferón tipo I que, como se explicó arriba, protege a las células infectadas y a las células cercanas, y el interferón tipo II el cual activa a los linfocitos y a las células que presentan antígenos, con lo que aumenta la eficiencia de la respuesta serológica y celular de inmunidad adquirida.

El gen K205R no-asignado del ASFV inhibe las dos vías del interferón, el tipo I y el tipo II.

En estos experimentos se utilizó el modelo del gen reportero de la luciferasa. Como puede verse en la figura 2, la señalización de las vías de interferón tipo I y II, medida a través de los genes reporteros de la luciferasa (ISRE para el tipo I y GAS para el tipo II), se inhibió en un 50-70% cuando las células fueron estimuladas con IFN α o IFN γ , respectivamente. El gen K205R también inhibió la inducción del promotor IFN β por el sustituto del virus de ARN de doble cadena viral (Fig. 3) y, para comprobar que este efecto era independiente de la activación del factor de transcripción NF κ B, se utilizó la construcción del gen reportero para la luciferasa PRD2/NF κ B (Fig. 4).

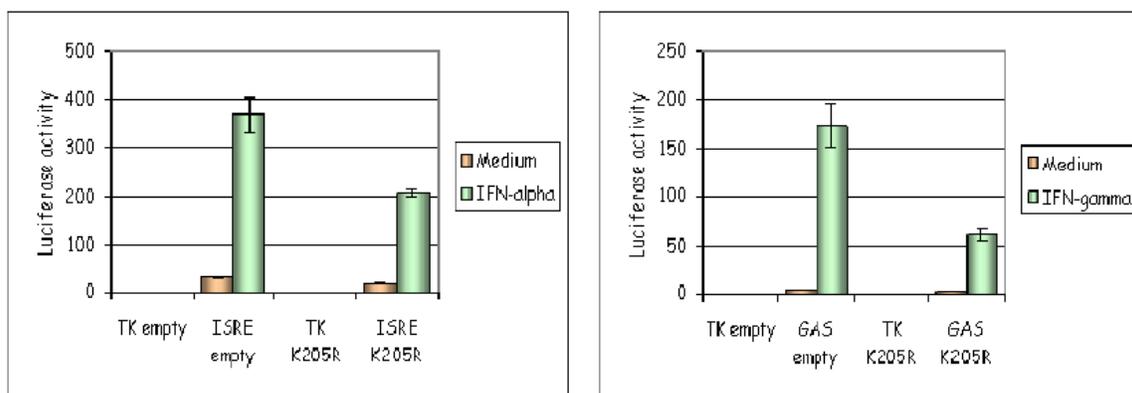


Figura 2. K205R “no asignado” inhibe ambas vías del IFN, tipo I (ISRE) y tipo II (GAS).

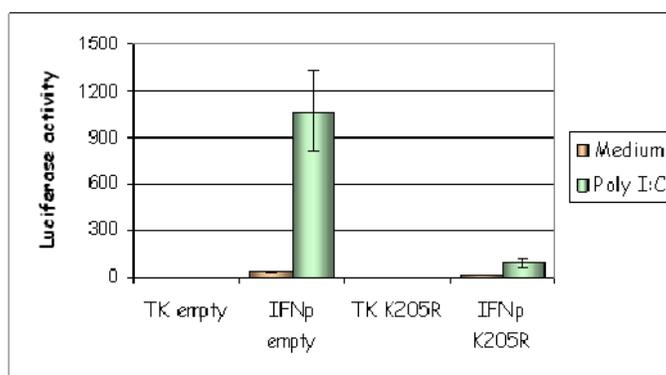


Figura 3. K205R inhibe la inducción del promotor para IFNβ.

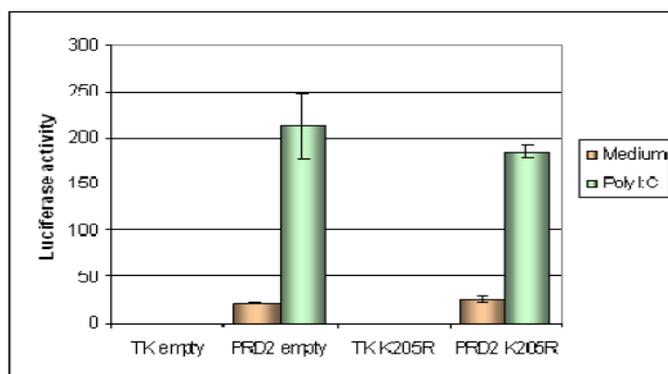


Figura 4. La Inhibición de la inducción del promotor para IFNβ es independiente de NFκB.

La identificación del gene K205R del ASFV se realizó mediante la tecnología del “doble híbrido” en levadura. Esto fue importante, no sólo para entender el mecanismo de inhibición y con ello diseñar nuevas herramientas terapéuticas, sino también para obtener una patente del gen y utilizarlo como reactivo o como una vía para obtener una vacuna de virus vivos o patógenos mutados a los que se les haya eliminado un gen. En forma interesante, este sistema del “dos híbridos” en levaduras reveló una interacción con STAT-2, un importante regulador de las respuestas del interferón.

El gen A276R “no asignado” del ASFV inhibe al promotor del IFN β e induce la actividad del NF κ B

Utilizando la tecnología de gen reportero descrita previamente, se encontró que el gen A276R inhibe la respuesta a poly I:C e incrementa la activación del NF κ B por los ésteres de forbol (PMA, ácido forbol-miristato) (Fig. 5). No hubo una respuesta significativa del gen en la activación de interferón tipo I y tipo II utilizando ISRE o GAS, respectivamente.

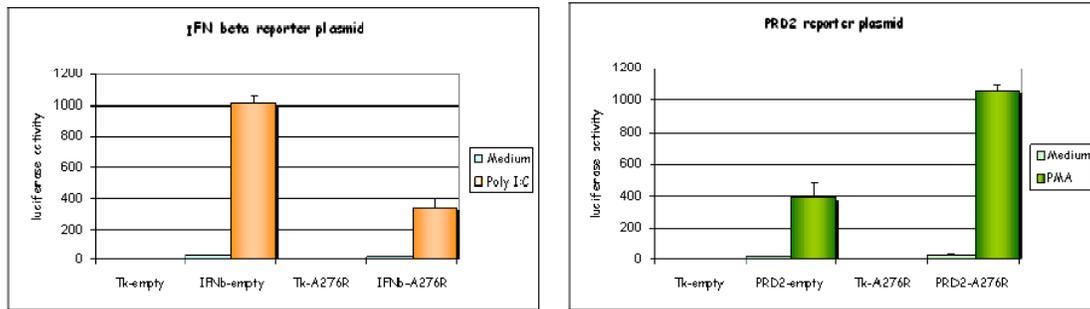


Figura 5. Inhibición del promotor IFN β e inducción de la actividad de NF κ B por A276R

El gen A276R “no-asignado” del ASFV también evita el arresto G₀/G₁.

Todos los virus con DNA manipulan el ciclo celular con el fin de utilizar los componentes celulares del hospedero para su replicación, síntesis de proteínas y ensamblaje viral. Como puede verse en la figura 6, las células transfectadas con retrovirus recombinantes que contienen A276R evitan el arresto G₀/G₁ que ocurre al cultivar las células en medio con poco suero. En el experimento que se presenta en la figura 6, hubo un aumento significativo de células en fase S en el transfectante recombinante A276R. El análisis del ciclo celular se hizo mediante FACS de las células teñidas con yoduro de propidio para cuantificar la cantidad de DNA intracelular y, por tanto, la etapa del ciclo celular.

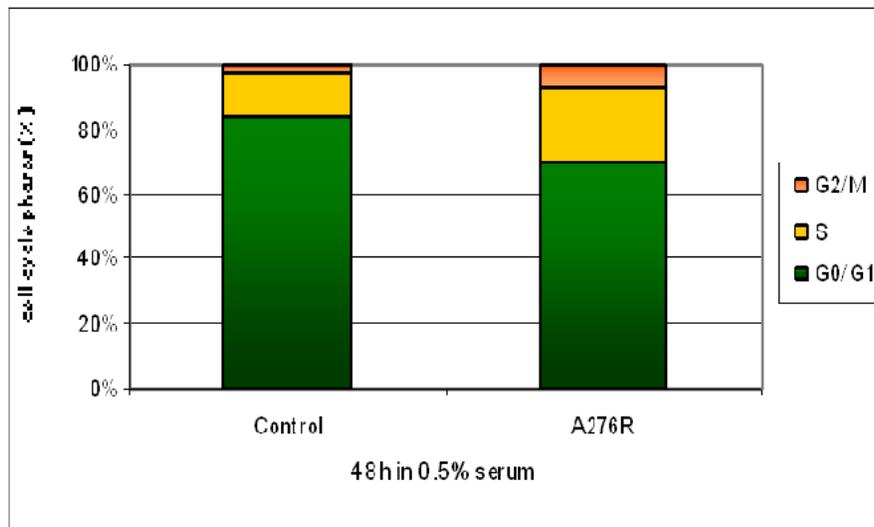


Figura. 6 A276R sobrepasa el arresto G₀/G₁.

Otro gen del ASFV interfiere con la señalización del receptor TLR.

Los principales participantes en la inmunidad innata son los fagocitos, como los neutrófilos, macrófagos y las células dendríticas. Estos fagocitos destruyen a los patógenos al rodearlos y digerirlos. También pueden discriminar entre patógenos y ellos mismos mediante la familia de los receptores TLRs. El TLR es un receptor transmembranal tipo 1 caracterizado por la presencia de un dominio extracelular que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR) así como un dominio citoplasmático (dominio TIR).

El ASFV está adaptado a sobrevivir en células hospederas tanto de invertebrados como de vertebrados. Ambos tienen mecanismos de defensa regulados por el sistema del TLR. En el hospedero porcino, el virus infecta principalmente al macrófago, una célula clave de la respuesta innata y con notable expresión de TLR. Por estas razones, el genoma del ASFV se sometió a un profundo análisis informático en donde se identificó al gen pI329L. Las características generales de I329L (del aislado BA71V del ASFV) están almacenadas en la base de datos Uniprot (código: I329_ASFB7). Presenta un péptido señal, seguido por un dominio extracelular de 222 aminoácidos, una región transmembranal de 21 residuos y un dominio C-terminal intracelular de 69 aminoácidos. La proteína codificada por este gen muestra una serie de sitios potenciales de glicosilación (GlcNAc) en los aminoácidos 32, 39, 44, 76, 82, 101, 105, 219. A primera vista, la proteína no mostró ninguna similitud clara con otras proteínas en las bases de datos, pero después de una alineación múltiple con proteínas de TLR, notamos una similitud significativa entre I329L y Toll3 de *Drosophila melanogaster*, específicamente en una área de repetición rica en residuos de leucina y localizada en el centro de la proteína (Fig. 7).

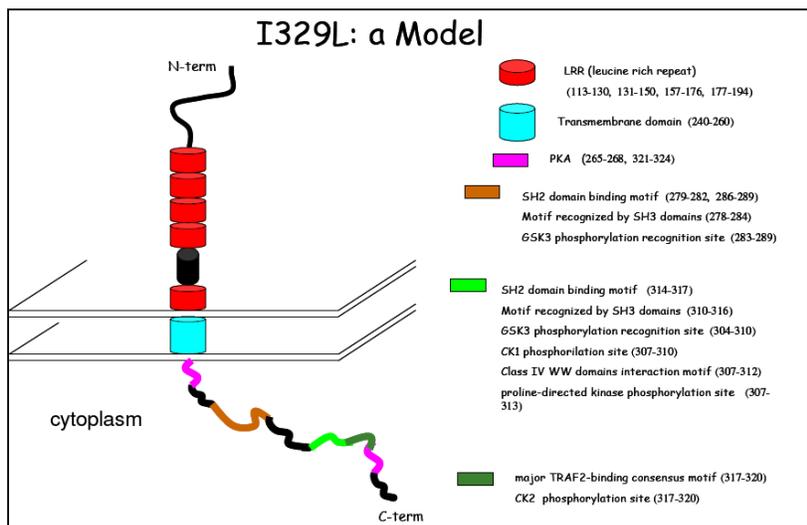


Figura 7. Modelo hipotético de I329L basado en herramientas bioinformáticas. La región conservada es extremadamente rica en residuos de leucinas y los TLRs tienen muchos de estos motivos. La parte extracelular de la molécula está formada de repeticiones LRR, un motivo importante para la interacción de estas proteínas con otras moléculas entre proteínas y otras moléculas. Aunque I329L no muestra claramente un dominio TIR, tiene similitud con los TRIFs en su dominio citoplásmico, lo que sugiere que I329L puede modular la señalización mediante su interacción con TRIF.

Las células 283T fueron transfectadas por un lado con un plásmido que codifica para el TLR3, otro con el reportero que contiene luciferasa corriente abajo de la secuencia de unión NFκB (PRD2) y, finalmente, con el plásmido que contiene el gen clonado I329L del ASFV. Los controles experimentales incluyeron células con el vector del gen I329L, pero sin un inserto (EV),

y células con el plásmido sin el sitio de unión NF κ B, llamado TK (control de fondo). Como puede verse (Fig. 8) la activación de NF κ B ocurrió en las células 293T transfectadas con TLR3 y estimuladas con poly I:C. Esta activación de NF κ B dependiente de TLR3 fue inhibida por el gen I329L de ASFV a todas las concentraciones probadas del ligando, poly I:C.

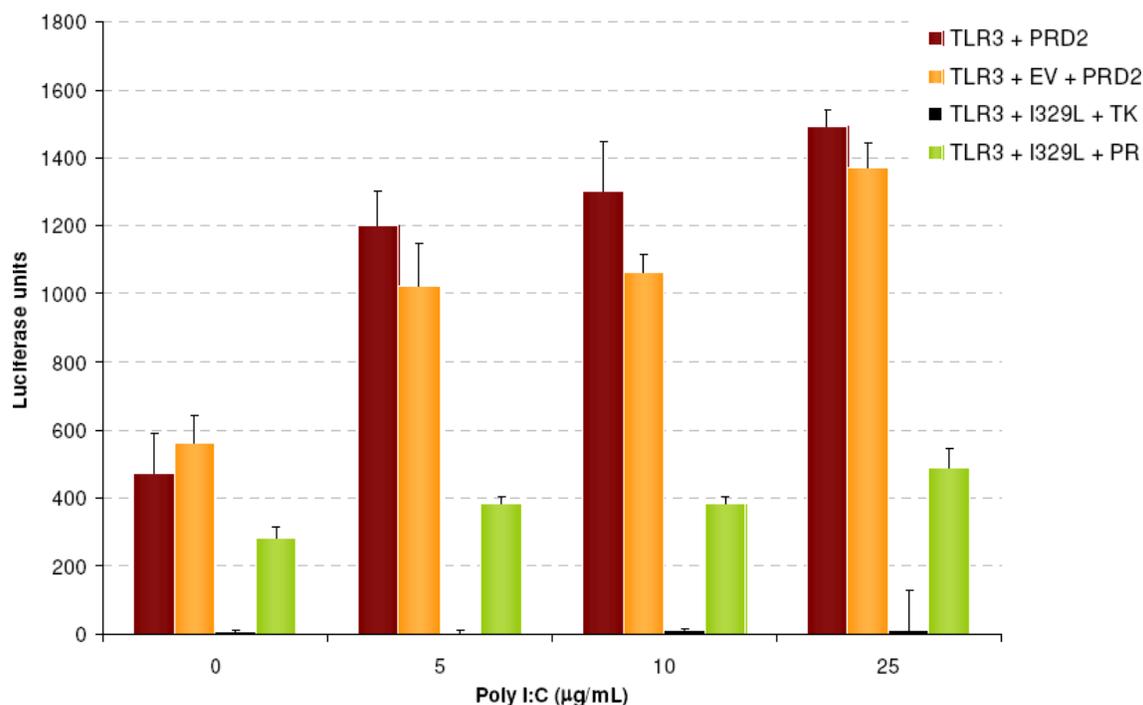


Figura 8. Efecto de I329L sobre la activación NF κ B dependiente de TLR3 inducida por poly I:C.

Conclusiones

Se han identificado mediante pruebas funcionales tres genes “no-asignados”, no homólogos en el genoma de ASFV que codifican para moléculas de evasión en el hospedero y que son, por ello, candidatos para la construcción de una vacuna de virus vivos atenuados por la eliminación de gen. Dos genes inhibieron las respuestas de IFN por diferentes mecanismos, y uno de ellos también manipuló el ciclo celular. Un tercer gen inhibió las respuestas generadas por el receptor TLR3. Los futuros trabajos para determinar el mecanismo de acción de estos genes virales de evasión tendrán un interés fundamental inmediato y una posible relevancia práctica.

- Búsqueda de nuevos genes de evasión del virus del herpes para producir una vacuna atenuada mediante la eliminación de genes.
- Inhibición de respuestas del IFN tipo I y tipo II con ORF36 del gen “no asignado” MHV-68.

El gen “no-asignado” ORF36 del virus del herpes es una secuencia conservada en todos los virus del herpes α , β y γ de humano y el γ del ratón MHV-68. Cuando se clonó y transfectó en células Vero y se probó en ensayos de reportero, inhibió la inducción de ambos interferones, tipo I y tipo II (Fig. 9). En forma interesante, ORF36 contiene un dominio de cinasa. La mutación de un sólo aminoácido en el probable dominio catalítico (lisina a glutamina) produjo un gen que ya

no inhibe la inducción de la respuesta del IFN (Fig. 10). La identificación del sustrato con el que interactúa esta cinasa viral podría proporcionar nuevas estrategias para modular la respuesta del IFN. De la misma manera queda por verse si la eliminación de la actividad de cinasa del virus proporcionará un abordaje adecuado para construir una vacuna de virus vivos atenuados no-patógenos

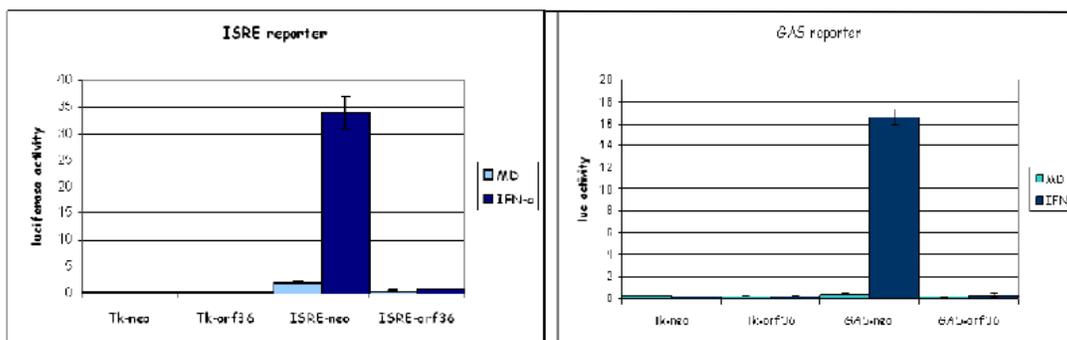


Figura 9. ORF36 inhibe la inducción del IFN tipo I y tipo II

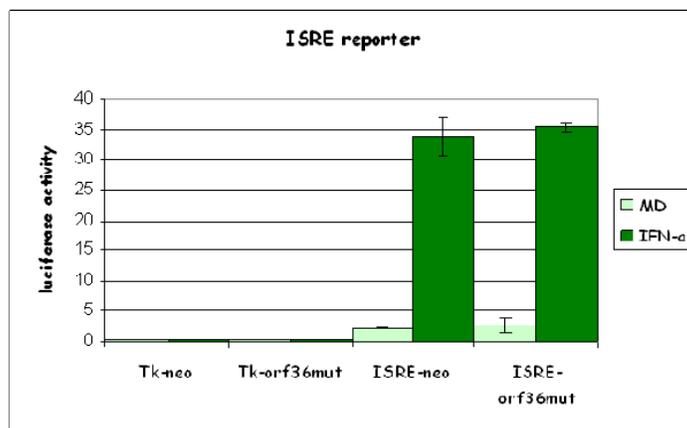


Figura 10. Mutación de K108Q en el dominio cinasa de ORF36 suprime su efecto inhibitorio sobre las respuestas del IFN.

Arresto del ciclo celular en la etapa de G2 seguido por apoptosis por el gen “no asignado” UL24 del virus del herpes y su posible aplicación a la terapia de cáncer.

El gen no asignado UL24/ORF20 del virus del herpes es otro ejemplo de una secuencia conservada en todos los virus del herpes del ratón y del humano. Cuando se clonó dentro del sistema de lentivirus y se introdujo en células humanas o de ratón, produjo arresto del ciclo celular G2/M (Fig. 11). Se transfectaron células de ratón (NIH3T3) con el retrovirus no-recombinante control (pSIN-FGO) o con el retrovirus recombinante UL24 (de mHV68) (pSINUL24) y a diferentes tiempos se analizó el ciclo celular mediante FACS de células teñidas con yoduro de propidio. Como puede verse en la figura 11, hay una acumulación progresiva de células con contenido doble de DNA cuando se transfectaron con el plásmido recombinante UL24. Se obtuvo un resultado similar en células HeLa humanas cuando se transfectaron con los homólogos UL24 de los virus del herpes α (HSV-1), β (HCMV) y γ (virus de Kaposi) (datos no mostrados).

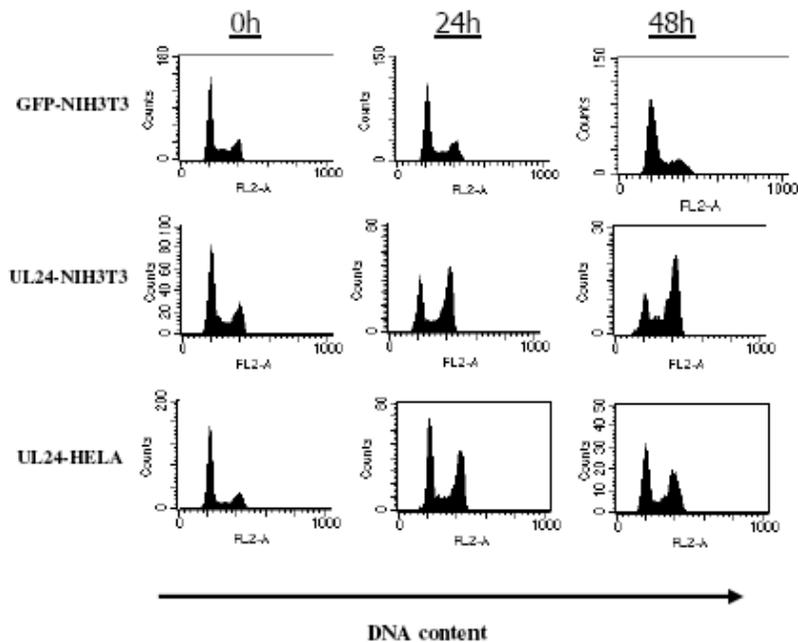


Figura 11. UL24 de MHV68 induce arresto G2/M en células murinas y humanas.

La identificación en las células transfectadas con UL24 recombinante (identificadas por la fluorescencia de la GFP) de la proteína viral (anticuerpo HA) y de la fragmentación nuclear apoptótica (DAPI) demostró claramente que a las 72 h (verde) las células transfectadas que expresaban la proteína viral (rojo) contenían núcleos fragmentados (azul) (Fig. 12, Parte superior). La conclusión se confirmó mediante una segunda prueba para apoptosis, la prueba "Tunnel", la cual detecta la degradación del ADN y se visualiza mediante de FACS (Fig. 12, Parte inferior).

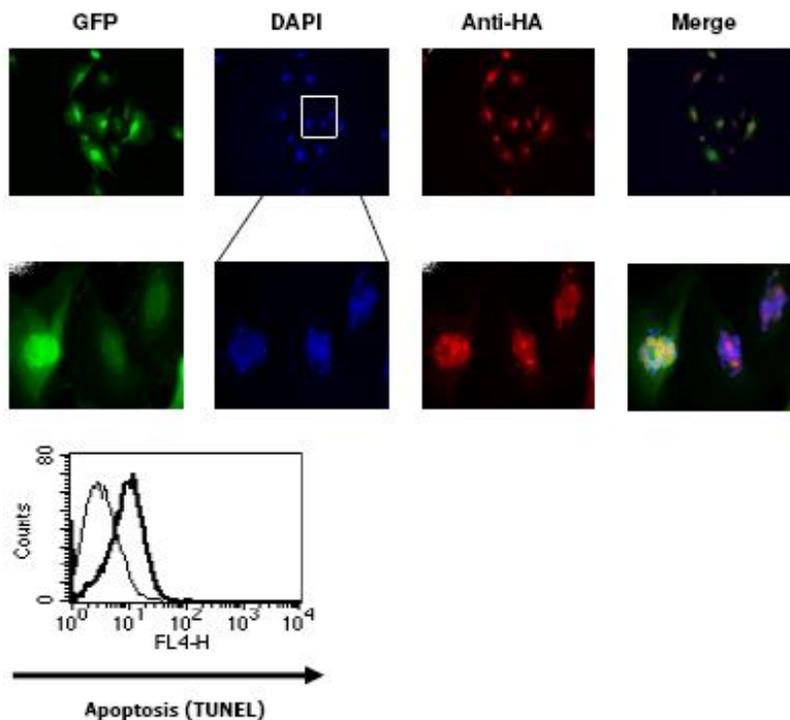


Figura 12. Células NIH3T3 que expresan en forma estable UL24 entran en apoptosis.

La localización de UL24 en el núcleo que se observa en la figura 12 se confirmó en forma similar después de 48 h de incubación (Fig. 13).

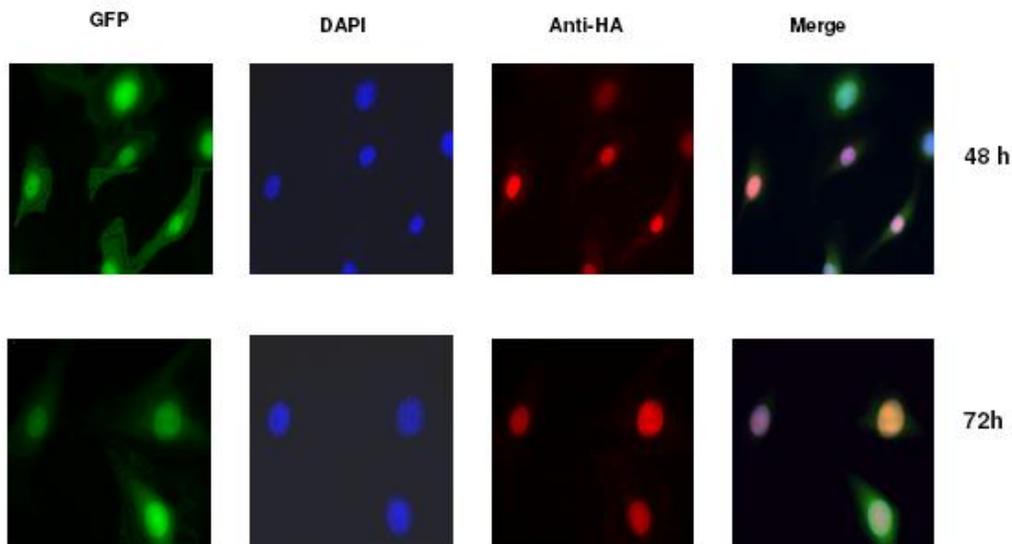


Figura 13. Localización nuclear de UL24 de MHV68 en células que expresan NIH3T3.

Con el objetivo de determinar el impacto de UL24 sobre la regulación del punto de chequeo G2/M, las células que expresan UL24 fueron sometidas a ensayos de co-precipitación y análisis de Western blot para la detección de tres proteínas críticas para la progresión del ciclo celular en G2/M y la localización nuclear.

En forma consistente con nuestras observaciones del arresto en G2/M, la ciclina B y la forma inactiva (Tyr15) de cdc2 se encuentran aumentadas después de la transfección (Fig. 14).

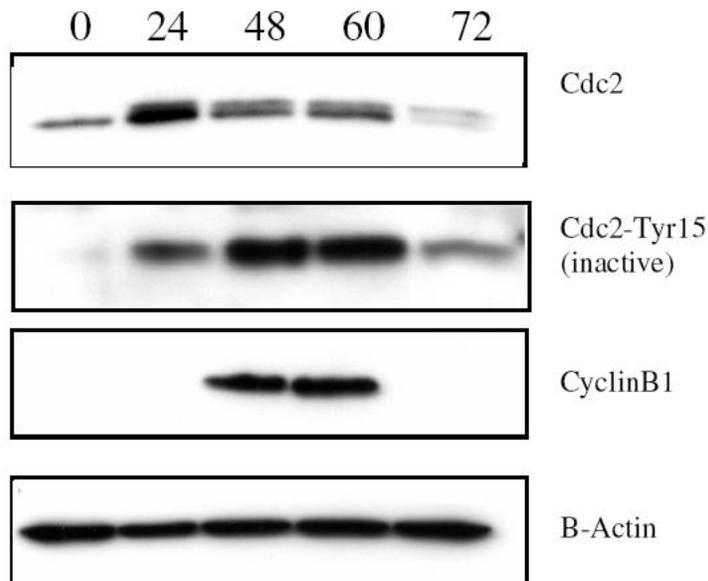


Figura 14. UL24 aumenta la fosforilación de cdc2 y la expresión de ciclina B.

Como prueba formal de que las células transfectadas con UL24 se arrestan en G2 antes de entrar en apoptosis, éstas se tiñeron a las 24 y 72 horas post-transfección con un anticuerpo dirigido contra la forma fosforilada de la histona H3, una proteína que sólo se expresa durante la mitosis. Los resultados muestran que las células transfectadas que expresan GFP no expresaron la histona fosforilada y, por consiguiente, no habían entrado en mitosis (Fig. 15).

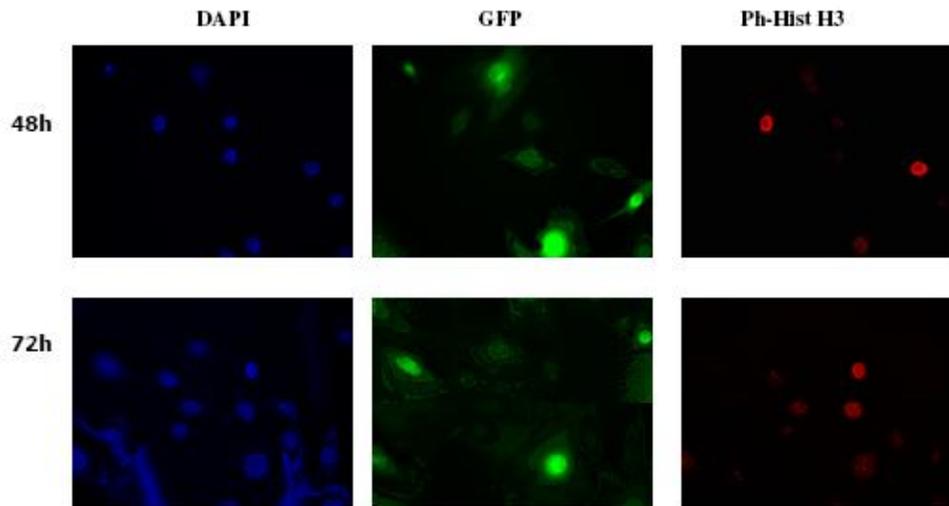


Figura 15. Células NIH3T3 que expresan UL24 en arresto en G2.

Finalmente, se comprobó que el evento clave en el arresto del crecimiento en la fase G2/M producido por UL24, se centra en *cdc2*, ya que la transfección con *cdc2* revierte el arresto en G2 (datos no mostrados).

Perspectivas

El gen UL24 del virus del herpes es un gen conservado “no-asignado” que induce arresto del ciclo celular y apoptosis en células murinas y humanas. El gen se conserva en los virus homólogos del herpes humano α (HSV-1), β (HHV-5) y γ (HHV-8) y su función es demostrable tanto en células humanas como de ratón.

El análisis bioquímico del ciclo celular consistió en el hallazgo de que UL24 induce un bloqueo en la etapa G2 del ciclo celular. Esto se confirmó con la observación de que el *cdc2* constitutivamente activo revierte el bloqueo inducido por UL24. Por tanto, UL24 inhibe la actividad del complejo ciclina B/*cdc2*.

Puesto que el gen UL24 está conservado en todos los virus del herpes, es posible que desempeñe un papel crítico en la patogénesis de la infección, de tal manera que trabajos futuros con este gen viral pueden dar pie a un abordaje nuevo para el control de este importante grupo de patógenos humanos. La liberación directa de UL24 a células cancerígenas, por ejemplo, por medio de liposomas marcados con anticuerpos y cargados con el gen UL24, ofrece una estrategia para la terapia de cáncer y la eliminación de tipos celulares definidos.

El ORF36, el cuál inhibe las respuestas del IFN tipo I y tipo II, lo cual favorece el establecimiento del virus y es también un candidato para la construcción de una vacuna de virus vivos atenuados. Finalmente, los trabajos futuros para determinar el mecanismo de acción de estos dos genes virales en la evasión de la respuesta inmune del hospedero tendrán un interés inmediato fundamental y una posible relevancia práctica.

Establecimiento de un modelo de leucemia linfoblástica aguda de células T mediante la expresión transgénica en células T de un gen viral de evasión que inhibe la activación de NFκB y de NFAT

Fenotipo de ratones transgénicos A238L de célula T

El gen A238L del ASFV se seleccionó ya que funciona como un inhibidor de la activación de NFκB y de NFAT en una variedad de tipos celulares, confirmando así que estos dos factores de transcripción se han conservado a lo largo de la evolución (Fig. 16). Ambos factores de transcripción juegan papeles importantes en el desarrollo del linfocito T, por lo que se contruyeron ratones transgénicos con expresión selectiva del transgen A238L en células T. Los ratones transgénicos resultantes tenían timos incrementados en tamaño, con pérdida de la organización tisular normal y con blastos CD4+CD8+CD69- en un gran estado de proliferación y en apoptosis.

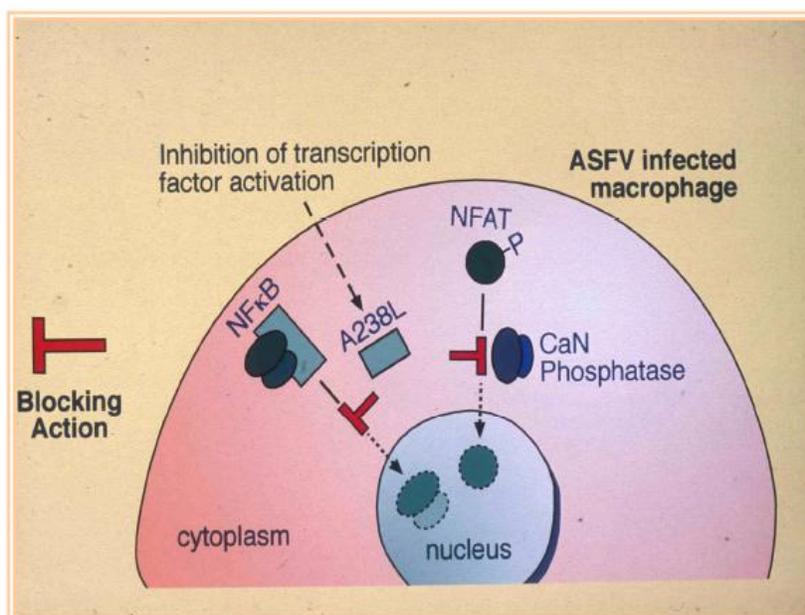


Figura 16. El ASFV con el gen A238L produce una proteína con dos dominios, uno que inhibe la activación de NFκB y el otro la activación de NFAT

Estas células CD4+CD8+CD69 transgénicas, cuando se transplantaron subcutáneamente, crecieron hasta convertirse en una gran masa tumoral, profusamente irrigada con sangre. La naturaleza angiogénica de las células era evidente por la abundante expresión del VEGF en las secciones de timo. Finalmente, las células tumorales hicieron metástasis a tejidos linfoides y no-linfoides.

En forma interesante, un ratón transgénico construido con una mutante del gen A238L que carece de la actividad de unión a la fosfatasa de calcineurina (por lo que no inhibe la activación de NFAT) tenía un timo totalmente normal, lo que sugiere que el fenotipo del A238L transgénico es el resultado de la inhibición de NFAT y NFκB o solamente de NFAT.

La expresión transgénica de células T con un gen de evasión del ASFV en el hospedero inhibe la activación de los factores de transcripción NFκB y NFAT (A238L), lo cual indujo un tumor de timo metastático y transplantable con propiedades angiogénicas.

El timo era enorme, desorganizado y contenía blastos CD4+CD8+CD69 de rápida proliferación y en apoptosis. Se conoce que las células de este fenotipo son inmaduras y de selección pre-tímica. Su naturaleza neoplásica es evidente ya que crecen *in vitro* y son transplantables *in vivo*. Es más, la expresión $\nu\beta$ es consistente con la transformación neoplásica.

El tumor era angiogénico, como se demostró por la expresión abundante de VEGF y la presencia de vasos sanguíneos en el timo transgénico. Además, las células transformadas hicieron metástasis tanto a órganos linfoides como a no-linfoides. Todas estas características sugieren que el ratón transgénico A238L de células T con el gen viral proporciona un modelo para estudiar la biología de la leucemia linfoblástica aguda de células T. Finalmente, el hecho de que el timo fuese normal en un A238L Tg, al que le falta el dominio de unión CaNPasa, sugiere que la transformación maligna depende de NFκB junto con NFAT o de NFAT solo.

Conclusiones

Hemos probado nuestra hipótesis de que los genes no-asignados, no-homólogos, de virus de DNA grande contienen genes que han evolucionado para manipular la biología de la célula hospedera y las respuestas inmunes. La detección funcional de tales genes no-asignados, no homólogos, de dos virus DNA muy diferentes, el virus de la Fiebre Porcina Africana tipo-pox y los virus del herpes, ha revelado genes que codifican para tres diferentes estrategias de inhibición de las respuestas del IFN, una estrategia que inhibe la señalización del receptor TLR, y dos más que manipulan la división celular. Ambas respuestas, del IFN y del TLR, son contribuyentes críticos a la inmunidad inmediata, innata a los virus y, así, su subversión proporciona una ventaja a los virus, una ventana para sobrevivir y replicarse. Por tanto, su eliminación ofrece un abordaje racional hacia la construcción de vacunas atenuadas. Los genes virales de evasión de la respuesta inmune del hospedero también proporcionan herramientas puntuales para entender y manipular la interacción hospedero-patógeno y así diseñar nuevas estrategias para el control de las infecciones por virus, y reactivos únicos para el control de enfermedades no infecciosas, tales como el cáncer y las enfermedades inflamatorias, y para la manipulación y terapia génica. Como un abordaje último, hemos podido generar un modelo para la leucemia linfoblástica aguda de células T mediante la construcción de un ratón transgénico que expresa selectivamente en células T un gen viral que inhibe la transcripción a través de NFκB y de NFAT.

Finalmente, una aplicación exitosa proporcionaría financiamiento suficiente para continuar con la actividad de nuestro equipo de trabajo por un año más y así explorar los mecanismos básicos responsables de la modificación significativa en el hospedero por acción de cinco nuevos genes virales "no asignados", que hemos podido definir mediante ensayos funcionales.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por los donativos EU(QLK3-2000-00362) y FCT(POCTI/MGI36407/1999)

Referencias

1. McFadden, G. y Barry, M. 1998. How poxviruses oppose apoptosis. *Seminars in Virology* 8: 429-442.
2. Smith, G.L. (Edit) 1998. Immunomodulation by virus infection. *Seminars in Virology* 8: 359-442.
3. Brodsky, F. (Edit) 1999. Pathogen subversion of cellular immunity. *Immunol. Reviews* 168: 5-315.
4. Alcami, A. y Koszinowski, U. H. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Molecular Medicine Today* 6: 365-372.
5. Branton PE y Roopchand DE 2001. The role of adenovirus E4 orf4 protein in viral replication and cell killing. *Oncogene* 20:7855-6.
6. Goldstaub D, Gradi A, Bercovitch Z, Grosman Z, Nophar Y, Luria S, Sonenberg N, y Kahana C. 2000 .Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* 20:1271-7.
7. Mulligan, R.C. 1993. The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926-932.
8. Heemskerk, M. H. M., Hooijberg, E., Ruizendaal, J. J., van der Weide, M. M. C., Kueter, E., Bakker, A. Q., Shumacher, T. N. M. y Spits, H. 1999. Enrichment of an antigenspecific T-cell response by retrovirally transduced human dendritic cells. *Cellular Immunology* 195: 10-17.
9. Lang, G. et al. 1988. The structure of the human CD2 gene and its expression in transgenic mice *The EMBO Journal* 7: 1675-82.

Semblanza del Dr. Michael Parkhouse



Estudio la carrera de Biólogo y realizó la maestría y el doctorado en el área de bioquímica en Londres. Hizo una estancia postdoctoral en el área de Inmunología en The Scripps and Salk Institutes, en USA. En la primera parte de su carrera fue miembro del Instituto Nacional de Investigaciones Médicas, en Londres, Reino Unido, y se dedicó a la investigación básica de la función y el desarrollo de los linfocitos; posteriormente sus estudios se enfocaron en las estrategias racionales para el diagnóstico y protección en las infecciones por parásitos y virus. Realizó una estancia sabática en el Departamento de Bioquímica del IPN, unidad Zacatenco, México. Posteriormente se desempeñó por dos años como director del Centro Nacional de Biotecnología en Madrid, España. Después de esto, tomó la responsabilidad de desarrollar el Departamento de Inmunología en el Instituto de Salud Animal (IAH), en el Reino Unido. Actualmente está a cargo de un grupo en Infección e Inmunidad en el Instituto Gulbenkian de Ciencia en Portugal, que estudia las estrategias de los virus para la manipulación y evasión de las respuestas inmunes del huésped.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

ACTIVACIÓN DE LEUCOCITOS A TRAVÉS DE RECEPTORES PARA INMUNOGLOBULINA G

Enrique Ortega, Claudia Hallal-Calleros y Paula Santoyo.
Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México.
Apartado Postal 70228, Cd. Universitaria, D.F. CP 04510, México.
ortsoto@servidor.unam.mx

Resumen

Los receptores para el fragmento Fc de la IgG (Fc γ Rs) juegan un papel muy importante en la activación de funciones efectoras celulares mediadas por anticuerpos IgG. Los Fc γ R son una familia heterogénea de receptores que no muestran una selectividad absoluta por las distintas subclases de IgG. Los receptores Fc γ R no poseen actividad intrínseca de cinasa, pero cuando son agregados por partículas opsonizadas o complejos antígeno-anticuerpo pueden desencadenar una cascada de señales bioquímicas que inicia por la activación de cinasas de tirosina de la familia Src, las cuales fosforilan residuos de tirosina en el receptor mismo o en cadenas asociadas a ellos. Estas tirosinas fosforiladas sirven de punto de anclaje y activación de la cinasa Syk. La cinasa Syk activada fosforila una variedad de sustratos intracelulares para la activación de las funciones efectoras. Aunque se conoce de manera general el mecanismo bioquímico por el cual los Fc γ Rs median la activación celular, y se han identificado un gran número de moléculas que intervienen en las vías de señalización intracelular que pueden ser activadas por la señalización a través de Fc γ Rs, queda por determinar la influencia de diferentes factores (de la estructura del agregado, del estado de activación de la célula, de las isoformas de Fc γ Rs expresadas, etc) sobre este mecanismo y por lo tanto sobre la respuesta celular.

Palabras clave: Receptores para anticuerpos, cinasas de tirosina, leucocitos

Abstract

Receptors for the Fc portion of IgG antibodies (Fc γ Rs) play key roles in activation of antibody-mediated effector functions of leukocytes. Fc γ Rs are a family of receptors whose members do not display distinct selectivity for the different IgG subclasses. Fc γ Rs have no intrinsic enzymatic activity, but when aggregated on the membrane of a cell, they trigger a biochemical cascade which initiates with activation of tyrosine kinases of the Src family. Src kinases phosphorylate specific tyrosine residues on the receptor itself or on its associated chains. The cytoplasmic kinase Syk binds to these phosphotyrosines, thus becoming activated. Once active, Syk phosphorylates a variety of intracellular substrates for activation of effector functions. Although in general terms the mechanism of signal transduction by these receptors is known, and many proteins involved in this process have been identified, the influence of different factors such as structural characteristics of the IgG aggregate, the maturation/differentiation state of the cell, etc, are not well understood.

Keywords: Receptors for antibodies, tyrosine kinases, Leukocytes

Introducción

Las inmunoglobulinas o anticuerpos juegan un papel muy importante en los mecanismos de defensa del organismo. Estas moléculas son de naturaleza glicoprotéica y son producidas exclusivamente por los linfocitos B, los cuales pueden expresarlos en su membrana como receptores para antígeno, así como secretarlos en forma soluble. Como receptores de membrana de linfocitos B, los anticuerpos median la activación de la célula inducida por la unión de un antígeno al sitio de combinación del anticuerpo. Este evento de reconocimiento es esencial para la activación del linfocito, el cual inicia un programa de proliferación (expansión clonal) y diferenciación que da origen a células productoras de moléculas de anticuerpos solubles que tienen la misma especificidad que el receptor del linfocito B que las originó. Por su parte, los anticuerpos solubles participan de distintas maneras en la eliminación de microorganismos o partículas extrañas. Varias de estas funciones involucran por un lado, la unión del anticuerpo soluble con el antígeno a través del sitio de combinación del anticuerpo (localizado en el fragmento Fab), y por otro lado la interacción de los anticuerpos con células efectoras a través de su porción constante, llamada segmento Fc (Fracción cristalizable). La interacción de los anticuerpos con células efectoras se lleva a cabo a través de receptores de membrana específicos para el segmento Fc (receptores para Fc ó FcRs) expresados por dichas células.

Se han descrito receptores para Fc específicos para cada una de las distintas clases de inmunoglobulinas (Fc α R, Fc δ R, Fc ϵ R, Fc γ R y Fc μ R). Los receptores FcR son glicoproteínas que se expresan en la membrana de una amplia variedad de células hematopoyéticas, como monocitos, macrófagos, linfocitos, células asesinas naturales (NK), mastocitos, eosinófilos, basófilos y plaquetas, así como en ciertas células epiteliales (placenta, hígado e intestino neonatal). La agregación de FcRs promovida por complejos antígeno-anticuerpo puede desencadenar, dependiendo del tipo celular, una gran variedad de respuestas entre las que se incluyen: secreción de citocinas, fagocitosis, pinocitosis, liberación de compuestos citotóxicos y de mediadores de la inflamación, estallido respiratorio, etc.

RECEPTORES PARA INMUNOGLOBULINA G (Fc γ R)

Los receptores para el Fc de la inmunoglobulina G (Fc γ R) son una familia de receptores de membrana expresados por la mayoría de las células hematopoyéticas. Estos receptores participan de manera importante tanto en la fase aferente como en la fase efectora de la

respuesta inmune adaptativa. En la fase aferente, regulan la activación de clonas de linfocitos B a través de su receptor para antígeno (BCR) y pueden regular la maduración de células dendríticas. Sus funciones en la fase efectora son más conocidas, sirviendo de puente entre la gran especificidad del reconocimiento del antígeno por los anticuerpos y la activación de leucocitos para realizar distintas funciones efectoras como fagocitosis, liberación de moléculas con actividad pro-inflamatoria, producción de citocinas y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Se reconocen actualmente cuatro tipos de receptores para IgG: Fc γ R I, Fc γ R II, Fc γ R III y Fc γ R IV. Esta clasificación se basa en diversos criterios como peso molecular, afinidad y especificidad por distintas subclases de IgG, diferencias antigénicas reveladas por anticuerpos monoclonales y estructura génica. Los receptores Fc γ R I, Fc γ R II y Fc γ R III se identificaron hace más de 25 años, y se han caracterizado estructural y funcionalmente con mayor detalle (Revisado en 1,2) (Figura 1). El receptor Fc γ R IV fue identificado recientemente (3, 4, 5) y su caracterización funcional es aún incompleta.

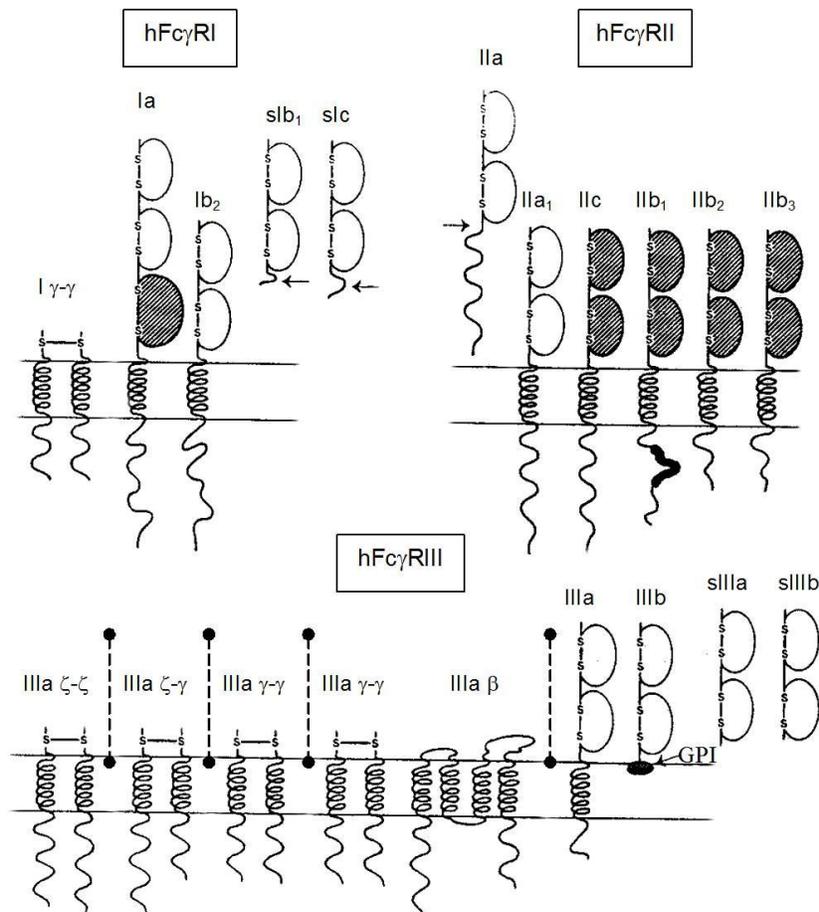


Figura 1. Representación esquemática de los receptores Fc γ R I, Fc γ R II y Fc γ R III humanos. Todos los Fc γ R pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, tienen regiones extracelulares compuestas por 2 o 3 dominios de inmunoglobulinas. Los Fc γ R I y IIIa se expresan en membrana como complejos oligoméricos, las subunidades (γ , ζ) asociadas se muestran en la figura. Dentro de las tres clases de Fc γ R existen formas solubles que se generan por tres mecanismos distintos: por codones de paro en su dominio extracelular (hFc γ R Ib1 y Ic), por procesamiento alternativo (hFc γ R IIa2) y por ruptura proteolítica (hFc γ R IIIa y IIIb).

Los receptores Fc γ RI, II y III humanos son codificadas por al menos ocho genes individuales, todos situados en el cromosoma 1, y la diversidad de sus productos es aumentada por procesamientos alternativos de los ARN mensajeros. Los tres tipos de receptores presentan una marcada homología en sus porciones extracelulares (70-95%), una alta homología en la porción transmembranal entre receptores del mismo grupo (50-76%), pero baja cuando se comparan distintos grupos. Las porciones citoplasmáticas presentan baja homología (16%) entre receptores de un mismo grupo y no hay homología entre receptores de grupos diferentes (6). El gene para el Fc γ RIV murino se localiza también en el cromosoma 1, y existen proteínas ortólogas en otras especies, incluyendo el humano (Fc γ R111A) (5). Exceptuando a los receptores del grupo II, los Fc γ Rs se expresan en membrana asociados a otras moléculas que participan en la señalización (ver adelante).

Desde el punto de vista funcional, los receptores Fc γ R se dividen en receptores activadores y receptores inhibidores (1). Los receptores activadores (Fc γ RI, Fc γ R111a, Fc γ R1111, Fc γ R111V) tienen en su estructura o en sus cadenas asociadas motivos ITAM (Motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptores). El receptor inhibidor (Fc γ R111b) expresa motivos ITIM (Motivo de inhibición basado en tirosina).

Cada una de las distintas clases de receptores Fc γ no es exclusiva de un tipo celular particular. Más bien, la mayoría de las células hematopoyéticas expresan al mismo tiempo más de un tipo de receptor, y algunas expresan al mismo tiempo los tres. Aunque distintos tipos de receptores Fc γ R pueden unir IgG de distintas subclases con afinidades distintas, no existe una selectividad entre los distintos tipos de receptores por alguna(s) subclases de IgG (7). Por otro lado, se ha demostrado tanto en células que expresan de forma natural más de una isoforma de receptores Fc γ , así como en células transfectadas con distintas isoformas, que los Fc γ R1a, 111a y 1111a pueden mediar las mismas funciones, tales como fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y estallido respiratorio (8, 9) (Tabla I).

Los Fc γ R existen tanto como receptores de membrana como en forma de moléculas solubles generadas por proteólisis de los receptores de membrana, o por procesamiento alterno de los transcritos. Los receptores solubles retienen la afinidad por la molécula de IgG y pueden llevar a cabo varias funciones biológicas.

Fc γ RI (CD64)

Los receptores Fc γ RI son los receptores con la afinidad más alta por IgG ($K_a = 10^7$ - 10^9 M $^{-1}$). Se expresan en la membrana como un complejo entre una cadena α (alfa) que contiene el sitio de unión de la IgG, y un dímero de cadenas γ (ver abajo). El Fc γ RI se expresa constitutivamente en monocitos y macrófagos, y es inducible en neutrófilos y eosinófilos. La cadena α tiene un peso molecular entre 65 y 70 kDa, y tiene una región extracelular de 292 aminoácidos que contiene tres dominios homólogos a los dominios de inmunoglobulinas, una región transmembranal de 21 aminoácidos, y un dominio citoplásmico de 61 aminoácidos. El tercer dominio extracelular es característica particular del Fc γ RI, ya que los Fc γ R111 y 1111 solo tienen dos dominios extracelulares. A este tercer dominio se le ha atribuido la alta afinidad del Fc γ RI por la porción Fc de la IgG.

Existen tres genes, altamente homólogos (98% de identidad de nucleótidos), que codifican para los Fc γ RI: A, B y C. Los genes para el hFc γ RI están formados por seis exones, dos de ellos codifican para un péptido líder, un exón para cada dominio extracelular y un solo exón para la región transmembranal y citoplásmica (10). El hFc γ R1A genera un solo transcrito que codifica para una molécula con tres dominios de inmunoglobulina (Fc γ R1a), esta isoforma es la más estudiada en la traducción de señales, pues es la única cuya expresión en la membrana

celular se ha demostrado. El hFc γ RIB da lugar a dos transcritos: el Fc γ Rib1 que posee dos dominios de inmunoglobulina y no tiene dominio transmembranal, y el Fc γ Rib2 que también carece de región transmembranal; por lo tanto estas dos isoformas son receptores solubles de baja afinidad con dos dominios de inmunoglobulina. En todas las células analizadas que expresan hFc γ RI se han encontrado los transcritos Fc γ R1a y Fc γ R1b2. El hFc γ RIC codifica para una proteína similar al Fc γ R1b2, una forma soluble y de baja afinidad.

Tabla I. Características generales de los receptores para Fc γ humanos

<i>Receptor</i>	<i>Genes</i>	<i>Transcritos</i>	<i>Subunidad asociada</i>	<i>Afinidad</i>	<i>Expresión</i>	<i>Inducción</i>	<i>Funciones</i>
hFc γ RI (CD64)	hFc γ RIA	hFc γ R1a	γ	10^8 - 10^9 M $^{-1}$	Monocitos, macrófagos,	Neutrófilos (IFN γ ,C-CSF) Eosinófilos (IFN γ)	Fagocitosis, ADCC, Generación de metabolitos reactivos del oxígeno y secreción de citocinas.
	hFc γ RIB	shFc γ R1b1 hFc γ R1b2	γ				
	hFc γ RIC	shFc γ R1c					
hFc γ RII (CD32)	hFc γ RIIA	hFc γ R1Ia1 shFc γ R1Ia2		< 10^7 M $^{-1}$	Células hematopo- yéticas nucleadas.		Fagocitosis, ADCC, Generación de metabolitos reactivos del oxígeno y secreción de citocinas.
	hFc γ RIIB	hFc γ R1Ib1 hFc γ R1Ib2					
	hFc γ RIIC	hFc γ R1Ib3 hFc γ R1Ic					
hFc γ RIII (CD16)	hFc γ RIIIA	hFc γ R1IIa	γ , ζ	$\pm 3 \times 10^7$ M $^{-1}$	Monocitos.	Monocitos (TGF β).	Fagocitosis, ADCC, Generación de metabolitos reactivos del oxígeno y secreción de citocinas.
	hFc γ RIIIB	hFc γ R1IIb shFc γ R1IIb		< 10^7 M $^{-1}$	Neutrófilos.	Eosinófilos (IFN γ).	

La cadena Fc γ R1a se asocia de manera no covalente con un dímero de cadenas gamma (γ) (11). Las cadenas γ no son esenciales para la expresión del Fc γ R1a en la membrana celular, pero son indispensables para la traducción de señales a través de este receptor. Estas cadenas son fosforiladas en residuos de tirosina después de la agregación de los receptores, y estas fosfotirosinas sirven como punto de unión y activación de proteínas con actividad de cinasas (ver abajo) (12).

Fc γ RII (CD32)

Son un grupo de receptores con baja afinidad por la IgG ($K_a < 10^7$ M $^{-1}$) expresados en todas las células hematopoyéticas que tienen Fc γ Rs, con excepción de las células NK. La familia del Fc γ RII consiste de al menos seis isoformas (a1, a2, b1, b2, b3 y c) generadas por procesamiento alternativo de tres genes diferentes (Fc γ RIIA, B, y C) (13). Todas las proteínas son muy similares, la heterogeneidad entre ellas se localiza en sus dominios citoplásmicos. Tienen

una masa molecular de 40 kDa en células humanas y de 40-60 kDa en células murinas. Por análisis de cDNA se ha concluido que estas proteínas están formadas por una región extracelular de 180 aminoácidos que contiene dos dominios de inmunoglobulina, una región transmembranal formada por 27 a 29 aminoácidos, y un tallo citoplásmico de tamaño variable (44 a 76 aminoácidos).

Fc γ RIIA y Fc γ RIIC: La expresión de sus productos génicos está restringida a células de origen mieloide (monocitos, macrófagos y neutrófilos, megacariocitos y plaquetas). Están involucrados en diversas respuestas efectoras tales como fagocitosis, endocitosis, estallido respiratorio, y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). El Fc γ RIIa2 no tiene región transmembranal, así que probablemente es un receptor soluble. La agregación de los Fc γ RIIa induce la fosforilación de varias proteínas, incluyendo al mismo receptor, PLC γ 1, PLC γ 2, Vav y GAP, así como de las cinasas Syk, Lyn, Fgr, Fyn y PI3K. No se ha demostrado la asociación de cadenas accesorias a ninguna de las moléculas de Fc γ RII, pero se sabe que su expresión en membrana y su capacidad de traducir señales no requieren de la expresión de ninguna cadena accesorias.

Fc γ RIIB: Sus productos génicos son expresados principalmente en linfocitos B, monocitos y macrófagos. En células B se han encontrado los transcritos Fc γ RIIb1, IIb2 y IIc; en células mielomonocíticas se han encontrado mRNA de los genes IIa1, IIb1, IIb2 y IIc, mientras que en megacariocitos se encuentran principalmente los transcritos IIa. Las isoformas Fc γ RIIb1, IIb2 y IIb3 difieren solamente en un inserto de 19 aminoácidos contenido en la región cercana a la membrana en los Fc γ RIIb1 y IIb3.

El Fc γ RIIb participa en la regulación negativa de la activación de células B mediada por el BCR. También es capaz de regular negativamente la activación de funciones efectoras por distintos receptores para anticuerpos, incluyendo receptores para IgA, IgG e IgE. Esta capacidad de regulación negativa depende de una secuencia de aminoácidos que se encuentra en su región citoplasmática, cuya fosforilación permite el reclutamiento de fosfatasa de tirosina y de lípidos (ver abajo) (14).

Fc γ RIII (CD16)

Los Fc γ RIII son receptores con peso molecular entre 50 y 80 kDa, y con baja afinidad por IgG. Son codificados por dos genes diferentes, A y B, y existen al menos tres diferencias polimórficas entre los hFc γ RIII (15). Los productos de ambos genes codifican para proteínas con dominios extracelulares de 190 aminoácidos, con dos dominios de inmunoglobulinas.

Fc γ RIIIA: El gene Fc γ RIIIA codifica para un receptor transmembranal de 224 aminoácidos, que se expresa en macrófagos, células NK, linfocitos B y en células T (subgrupo γ/δ). Los Fc γ RIIIa se encuentran expresados en membrana asociados no covalentemente con un dímero de proteínas unidas entre sí por puentes disulfuro. Estas proteínas pueden ser dímeros de cadenas γ , (que originalmente se describieron como componentes del receptor de alta afinidad para IgE), dímeros de cadenas ζ (las cuales también forman parte del receptor de células T), o heterodímeros de cadenas γ - ζ (16). Estas cadenas asociadas son requeridas para la expresión del Fc γ RIIIa, y además de prevenir su degradación en el retículo endoplásmico, son esenciales para la traducción de señales a través de este receptor. El Fc γ RIIIa murino se ha logrado expresar por transfección cuando se elimina su dominio intracitoplásmico, por lo que se piensa que este dominio tiene una secuencia de retención que previene que el receptor sea dirigido a la membrana si no se asocia con la subunidad γ en el retículo (17). Este receptor puede mediar funciones efectoras como fagocitosis, ADCC y endocitosis. Su entrecruzamiento induce la

fosforilación y la activación de las cinasas Lck y Syk, y la fosforilación de las proteínas PLC γ 1, PLC γ 2, PI3K, GAP y Vav.

Fc γ RIIIB: El gene Fc γ RIIIB codifica para moléculas de superficie celular de 203 aminoácidos, que carecen de dominio transmembranal. Los Fc γ RIIIB se mantienen unidos a la membrana por medio de un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Se han encontrados expresado solamente en neutrófilos. Debido a que no poseen segmentos transmembranal ni citoplásmico, el mecanismo de transducción para la activación de funciones efectoras a través de esta isoforma es todavía sujeto de discusión.

Receptores multicadena de reconocimiento inmune (MIRRs)

Los receptores para IgG comparten varias características estructurales y funcionales con otros receptores involucrados en el reconocimiento inmune, como el receptor de antígeno de linfocitos T (TCR), el receptor para antígeno de células B (BCR) y el receptor de alta afinidad para inmunoglobulina E (Fc ϵ RI) (Fig. 2). Estos receptores se han agrupado en un conjunto llamado Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune (MIRRs por sus siglas en inglés) (18).

El TCR es un complejo que consiste en un heterodímero α - β , asociado a seis cadenas: una cadena CD3 γ , una CD3 δ , dos CD3 ϵ y dos ζ . El heterodímero $\alpha\beta$ contiene el sitio de unión del complejo MHC-peptido antigénico. En una subpoblación de células T el TCR está formado por cadenas γ - δ en lugar de las cadenas α - β . El dímero de cadenas ζ puede ser sustituido por heterodímeros de cadenas ζ - η o ζ - γ . El entrecruzamiento del TCR induce la secreción de citocinas, como Interleucina 2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, TNF, IFN γ , etc. El receptor para antígeno de linfocitos B (BCR) es un complejo multiprotéico compuesto por una molécula de inmunoglobulina expresada en la membrana celular asociada con un heterodímero de polipéptidos transmembranales (Ig α /Ig β o CD79 α /CD79 β) unidos entre sí por puentes disulfuro. El receptor de alta afinidad para IgE (Fc ϵ RI) que se expresa en células cebadas y basófilos, es un complejo formado por una cadena α asociada a una cadena β y a un homodímero de cadenas γ . El entrecruzamiento del Fc ϵ RI en mastocitos y basófilos da lugar a la liberación de gránulos preformados, que contienen histamina y una gran variedad de otras enzimas.

Semejanzas estructurales y funcionales de los MIRRs

Las cadenas de los MIRRs que conforman el sitio de interacción con el ligando (antígeno en caso de TCR y BCR, o con Ig en caso de FcRs) tienen entre sí importantes semejanzas estructurales. Constan de una porción extracelular (responsable del reconocimiento del ligando) que se encuentra anclada en la membrana a través de un dominio transmembranal y poseen un tallo citoplásmico corto. No tienen dominios con actividad enzimática intrínseca, por lo que requieren de la formación de complejos con otras proteínas (cadenas asociadas) que son esenciales para acoplarse a la vía de transducción de señales. Las porciones extracelulares de los receptores pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Asimismo, las cadenas asociadas a los MIRRs presentan un alto grado de homología entre ellas. La cadena γ que forma parte del complejo del Fc ϵ RI es la misma que se asocia al Fc γ RI y tiene un 55% de identidad en aminoácidos con una región de la cadena TCR ζ . Estudios de transfección han establecido que el Fc ϵ RI y el TCR, así como el Fc γ RIII son expresados en la membrana celular solo si un miembro de la familia de los genes ζ/γ está presente y, aparentemente, asociada al receptor. El dominio citoplásmico de varias cadenas asociadas de los MIRRs contiene un motivo consenso en su extremo carboxilo-terminal, caracterizado por residuos de tirosina y leucina con un espaciamiento preciso:

D/ExxxxxxxD/ExxYxxLxxxxxxxYxxL/I. A esta secuencia consenso se le ha dado el nombre de ITAM por sus siglas en inglés (Motivo de activación basado en tirosina del inmunoreceptor) (19). Este motivo se encuentra en la parte citoplasmática de las cadenas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ del BCR, en la cadena β del $Fc\epsilon RI$, en las cadenas γ del $Fc\epsilon RI$, $Fc\gamma RI$ y $Fc\gamma RIII$, en las cadenas γ , δ y ϵ del CD3, y en las cadenas ζ y η del TCR.

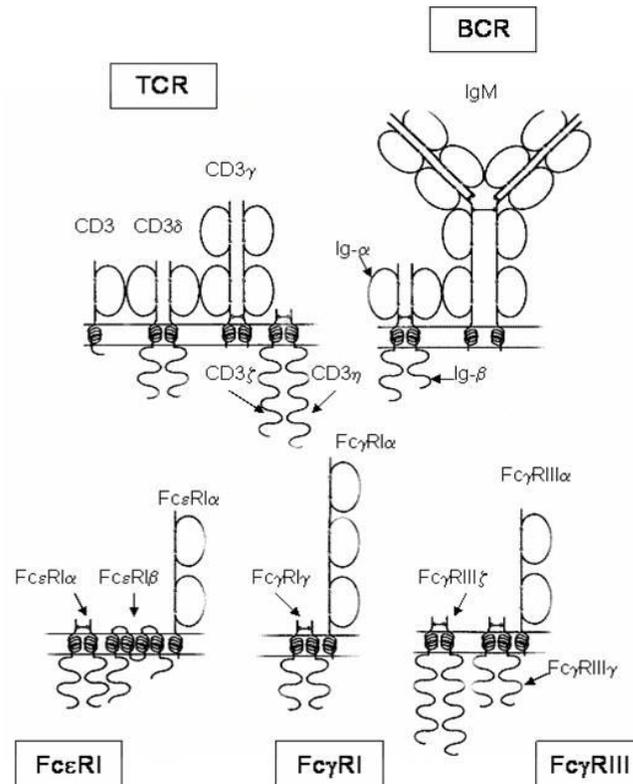


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de los Receptores Multicadena de Reconocimiento Inmune (MIRRS).

Los ITAMs juegan un papel esencial en el acoplamiento de las vías de traducción de señales a través de los receptores que los contienen. Las tirosinas presentes en estos motivos son fosforiladas como consecuencia de la agregación de los receptores, creando sitios de unión para proteínas que participan en la señalización (tanto proteínas con actividad enzimática como proteínas adaptadoras) que se unen a través de sus dominios SH2. Algunos receptores poseen varios ITAMs, por ejemplo, dentro del complejo TCR-CD3 cada cadena ζ posee tres ITAMs y las cadenas γ , δ y ϵ del CD3 tienen uno cada una. El significado de la variabilidad y multiplicidad de estos motivos aún no es claro, pero se ha observado que además de la gran importancia de las tirosinas que son fosforiladas, los aminoácidos que las rodean son determinantes en la especificidad de la asociación del ITAM con los dominios SH2 de distintas proteínas (20, 21). Estas observaciones sugieren que cada receptor puede reclutar distintas proteínas dentro de los complejos de señalización, y que aún un mismo ITAM puede reclutar distintas proteínas dependiendo del entorno intracelular en que se encuentre.

Otra similitud entre los MIRRS es el mecanismo de activación. Se ha demostrado que para la activación celular a través de estos receptores no es suficiente la ocupación del receptor

por su ligando, sino que es necesaria la agregación de los receptores (revisado en 22). Aún mas, se ha demostrado que el entrecruzamiento de los receptores por anticuerpos específicos para sus cadenas (aún en ausencia de ocupación por el ligando), es suficiente para inducir la activación. La agregación de estos receptores sobre la membrana de las células, ya sea por interacción directa con el antígeno (BCR) o con fragmentos antigénicos (TCR), o bien indirectamente, a través de la interacción con anticuerpos, así como de manera experimental utilizando anticuerpos específicos, brinda la señal para que se inicie una cascada bioquímica intracelular que desemboca en la activación de diversas respuestas por la célula.

También existe entre los MIRRs una considerable similitud en las vías bioquímicas intracelulares que participan en la activación de la célula. Ninguno de los receptores tiene dominios con actividad enzimática intrínseca, pero se han encontrado proteínas que tienen actividad de cinasa asociadas a estos receptores o a sus cadenas. El evento bioquímico más temprano detectado después del entrecruzamiento de los receptores es la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Las cinasas de las familias Src y Syk/ZAP-70 juegan un papel central en los eventos de fosforilación implicados en las fases iniciales del mecanismo de transducción de señales por los MIRRS.

Transducción de señales por MIRRS. Papel de las cinasas Src y Syk

Como se mencionó arriba, la agregación de los receptores MIRRs conteniendo ITAMs es necesaria para que se inicie la cascada de activación. Se ha postulado que la agregación de las cadenas con ITAMs amplifica la señal porque incrementa la concentración local de moléculas de señalización (23). La agregación de los receptores inducida por la unión del ligando induce la fosforilación de las tirosinas del ITAM por cinasas de la familia Src. De esta familia, nueve miembros han sido caracterizados estructuralmente (*p60Src*, *p55Blk*, *p56Lck*, *p59Fyn*, *p53/56Lyn*, *p62Yes*, *p56/59Hck*, *p58Fgr*, y *p60Yrk*). Las cinasas de la familia Src tienen entre sí una alta homología y comparten un mecanismo de activación general. El extremo amino terminal se encuentra acilado, usualmente palmitoilado o miristoilado, lo que permite la asociación de las cinasas a la cara interna de la membrana de la célula. Las cinasas se mantienen en estado inactivo por la fosforilación de una tirosina del extremo carboxilo terminal. La cinasa responsable de fosforilar este residuo es Csk (C-terminal Src Kinase). La fosforilación de esta tirosina permite una interacción intramolecular entre el extremo C-terminal (que contiene el dominio de cinasa) y el dominio SH2 de la molécula. Esta interacción mantiene a la cinasa en una conformación en la cual el sitio activo es inaccesible. La defosforilación de la tirosina del extremo C-terminal por fosfatasa como CD45 hace que la interacción entre el dominio de cinasa y el dominio SH2 se pierda, y la cinasa pueda expresar su actividad catalítica (Figura 3). La cinasa puede autofosforilarse en un residuo de tirosina cercano al sitio activo, lo que mantiene a la cinasa en su conformación activa. La cinasa activa puede entonces fosforilar las tirosinas de los ITAMs de las cadenas de los receptores MIRRs, lo cual permite el reclutamiento de las cinasas Syk o ZAP-70. Las cinasas Syk y ZAP-70 contienen dos dominios SH2, que interactúan con las dos fosfotirosinas del motivo ITAM. Esta interacción induce la actividad catalítica de las cinasas. La mutación de cualquiera de las dos tirosinas del ITAM impide la activación de Syk y la señalización.

Las cinasas Syk y/o ZAP-70, una vez activadas por su unión a ITAMs fosforilados, fosforilan otras proteínas celulares que participan en la señalización, incluyendo moléculas adaptadoras como LAT (linker for activation of T cells), BLNK (B cell linker protein) y SLP76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa), lo que lleva a la formación de complejos de señalización en la membrana, facilitándose la activación de enzimas involucradas en las vías de señalización como la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K), fosfolipasa C γ (PLC γ), y otras. La PLC γ actúa sobre fosfolípidos de inositol de la membrana, dando lugar a la generación de diacilglicerol (DAG) y de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3). El IP3 tiene receptores en el retículo endoplásmico, y su unión causa la liberación de iones Ca²⁺ almacenados, que actúan como segundos mensajeros.

El aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol, aunado a la producción de DAG, da lugar a la activación de la proteína cinasa C ó PKC (cinasa de serina y treonina), con la resultante fosforilación de una serie de substratos que participan en la respuesta celular. Las relaciones causales, temporales y de modulación recíproca entre estas enzimas, así como su relación con las vías específicas de señalización de los distintos FcR, varían dependiendo del receptor que es activado, del tipo de célula que es estimulada, así como del estado de maduración y activación celular (24). (Figura 4).

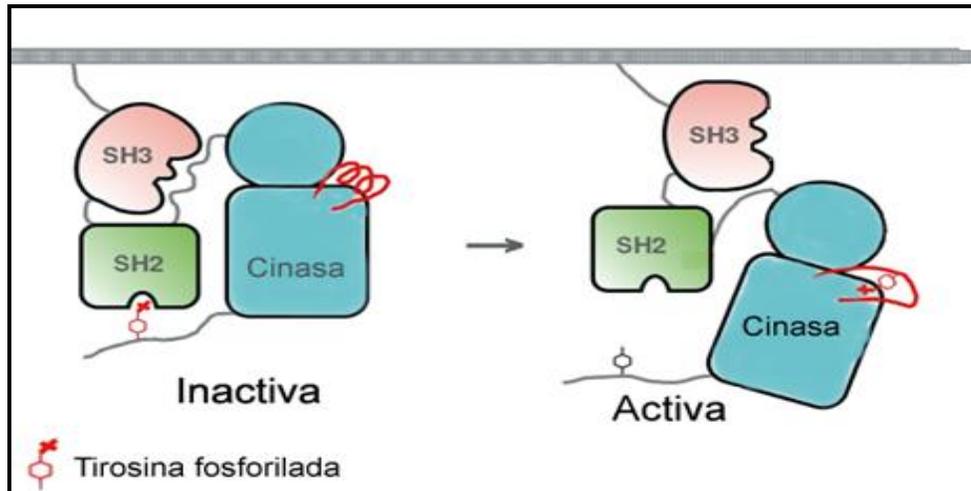


Figura 3.- Representación esquemática de la activación de cinasas de la familia Src.

La cinasa se asocia a la cara interna de la membrana por acilación del extremo N terminal. La cinasa consta de un dominio SH3, un dominio SH2 y el dominio de cinasa. La cinasa se mantiene en una conformación inactiva por la interacción de un residuo de tirosina del extremo carboxilo terminal (Tyr^{529}), con el dominio SH2. La defosforilación de este residuo permite a la cinasa adquirir una conformación extendida y puede ser fosforilada en Tyr^{418} , un residuo cercano al sitio activo. En esta conformación es catalíticamente activa (modificado de 51).

Hay numerosas evidencias que apoyan el modelo de transducción de señales por MIRR resumido arriba. Así por ejemplo, se ha demostrado que macrófagos derivados de ratones deficientes para las cinasas Hck, Fgr y Lyn, que son las principales cinasas de la familia Src expresadas en células mieloides, muestran una reducción muy importante en la fosforilación de los motivos ITAM, la activación de Syk, y la capacidad fagocítica (25). Además, mutaciones en las tirosinas de los motivos ITAM, o en los dominios SH2 de Syk, que impiden la asociación de Syk a los ITAM fosforilados, inhiben completamente las respuestas funcionales mediadas por receptores Fc (26).

Aparte del papel de las cinasas Src en la fosforilación de los ITAMs, aparentemente estas cinasas participan de otras maneras en la activación de funciones mediadas por receptores FcR como la fagocitosis, ya que el fenotipo con respecto a la fagocitosis de los ratones deficientes de las cinasas Hck, Fgr y Lyn, es diferente al fenotipo de los ratones deficientes de Syk: la falta de cinasas Src afecta la polimerización de actina debajo de la copa fagocítica, mientras que la deficiencia de Syk impide el cerrado de la vesícula (25-27). Asimismo, se ha demostrado que en la señalización por el Fc ϵ RI, las cinasas Src fosforilan a la proteína adaptadora Gab2. Por otro lado, las cinasas Src también participan en la fosforilación de motivos ITIM, regulando negativamente la señalización por los ITAMs (ver abajo).

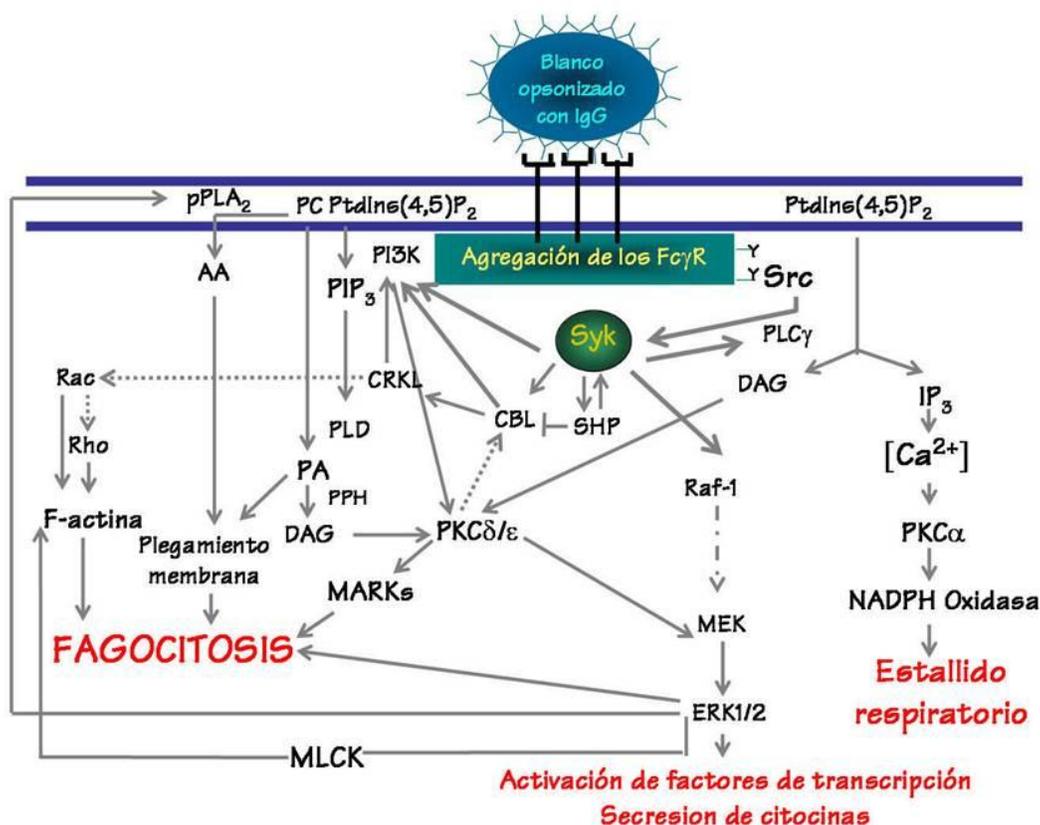


Figura 4. Señales bioquímicas iniciadas por el entrecruzamiento de los Fc γ R. El entrecruzamiento de los Fc γ R induce la activación de cinasas de la familia Src y de la familia Syk. Cinasas Src fosforilan y se asocian a las tirosinas de los motivos ITAM y activan a Syk. A su vez Syk activa a distintas enzimas involucradas en distintas funciones celulares. Fc γ R, Receptores para IgG; PI3K, Fosfatidilinositol 3-cinasa; Fosfolipasa C γ , PLC γ ; Fosfolipasa D, PLD; Fosfolipasa A2, pPLA $_2$; Fosfatidato fosfohidrolasa, PPH; Proteína Cinasa C, PKC; Cinasa activada por mitógenos, MEK; Cinasa regulada por señales extracelulares, ERK; Cinasa de la cadena ligera de la miosina, MLCK; Diacilglicerol, DAG; Ácido araquidónico, AA; Fosfatidilcolina, PC; Ácido araquidónico, AA; Iones calcio, [Ca $^{2+}$]; Fosfatidilinositol trifosfato, PIP $_3$; Fosfatidilinositol bifosfato, PtdInsP $_2$; inositol trifosfato, IP $_3$; Substrato para PKC rico en residuos de alanina y miristoilado, MARK; Proteína del linfoma de linaje B-casitas, Cbl; Proteína relacionada al oncogene Crk, CRKL; Proteína fosfatasa con dominios SH2, SHP.

Señalización río abajo de la cinasa Syk.

La cinasa de fosfatidilinositol (PI3-K) está involucrada en la señalización a través de los Fc γ R. Esta enzima genera fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP $_3$) al fosforilar en la posición D3 al anillo de fosfatidilinositol (PtdIns) y a otras especies fosforiladas de PtdIns, como el PtdIns(4)P y del PtdIns(4,5)P $_2$, que tienen un papel importante en la señalización (28). La PI3-K pertenece a una familia de enzimas homólogas en su dominio catalítico, el cual es denominado región de homología 1 (HR1) (29). Las PI3-K se agrupan en tres clases, basándose en su selectividad por substratos específicos en ensayos *in vitro*. De éstas, las PI3-K de Clases I y III están involucradas en la fagocitosis. La actividad de PI3-K clase III se requiere durante la maduración del fagosoma, mientras que la actividad de PI3-K de Clase I se requiere durante la

internalización de la partícula participando de manera directa en la extensión de pseudópodos (30).

Al menos una isoforma de PI3-K de clase IA se expresa en todos los tipos celulares de mamíferos y está involucrada en la activación celular. La cantidad de PI3-K activa aumenta con la estimulación de receptores que inician cascadas de fosforilación en tirosina (28). Las PI3-K de clase IA están involucradas en la fagocitosis (29), y las PI3-K de clase IB son activadas por la estimulación de receptores para quimioatrayentes (31).

Durante la fagocitosis, la actividad de PI3-K clase IA permite la extensión de los pseudópodos y la formación del fagosoma. En neutrófilos y macrófagos tratados con wortmanina (compuesto que inhibe a la PI3-K) se inhibe la fagocitosis mediada por $Fc\gamma R$ (28). En estos casos el macrófago es capaz de unir a la partícula opsonizada; sin embargo, no es capaz de internalizarla pues no ocurre la extensión de los pseudópodos. El arresto en la fagocitosis no se elimina si se disminuye el número de partículas, pero si se disminuye el tamaño de la partícula, y con ello la magnitud en la extensión del pseudópodo necesario para su internalización, se atenúa el efecto de la wortmanina (30, 32). El papel de PI3-K en la fagocitosis podría ser producir $PI(3,4,5)P_3$, que ayuda a reclutar proteínas involucradas en la reorganización del citoesqueleto de actina. Este producto se acumula en los sitios en donde se está formando el fagosoma. Algunas candidatas son las proteínas Vav y ARNO, la profilina y la gelsolina, $PLC\gamma 1$, la proteína cinasa B/Akt y a la miosina X (28, 33).

La cinasa ERK también se ha involucrado en la señalización a través de los $Fc\gamma R$. Esta cinasa pertenece a la familia de las cinasas de serina/treonina citosólicas activadas por mitógenos o MAP cinasas (MAPK). La actividad de estas cinasas se ha asociado a la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y otros procesos celulares (34). Las MAPK son las enzimas terminales de una serie de cinasas que se activan una a la otra de manera secuencial, a través de fosforilaciones, para propagar una cascada de activación celular. Estas cinasas sirven para amplificar y mantener la fidelidad de la cascada de activación, pues son selectivas en las interacciones con sus activadores y con sus sustratos.

Las cinasas ERK son activadas en respuesta a factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); o factores de diferenciación celular, como el factor de crecimiento nervioso (NGF). La agregación del $Fc\gamma RIIa$ y del $Fc\gamma RIIIb$ en neutrófilos humanos estimula la actividad de ERK (35). La activación de la vía de ERK media la comunicación entre el receptor y la vía de Ras, a través de la formación de complejos multiméricos entre proteínas adaptadoras y factores de intercambio de nucleótidos de guanina. En la activación mediada por $Fc\gamma R$ se ha observado el ensamblaje de la proteína adaptadora Grb2 y la proteína intercambiadora de GTP: SOS. Grb2/SOS conducen a la activación de proteínas G de bajo peso molecular como Ras, Rac y Rho. Sin embargo, se ha propuesto la existencia de vías alternas para la activación de ERK, que no involucran a Ras (36, 37).

La inhibición de ERK empleando al inhibidor PD98059 abate la fagocitosis mediada por $Fc\gamma R$ s en macrófagos. El papel de ERK en la fagocitosis puede estar asociado a la activación de la Fosfolipasa A2 (PLA2) y la producción de ácido araquidónico (AA) (38). La producción de AA por macrófagos requiere de la actividad de ERK. Si se inhibe la producción de AA, se impide la fagocitosis que puede reestablecerse si se agrega AA exógeno (39).

ERK también puede estar involucrada en la regulación del reordenamiento del citoesqueleto y la morfología de la célula, (38, 40). Los sustratos conocidos de ERK incluyen proteínas asociadas a citoesqueleto como la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK)(41).

Las proteínas cinasas C (PKC) son una familia de cinasas de serina/treonina que son activadas por diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina (PS) y en el caso de algunas isoformas, por iones Ca^{2+} . La actividad de PKC es necesaria para que se lleve a cabo la fagocitosis inducida por los $Fc\gamma R$, pues al eliminar el contenido de PKC de la célula, incubándola por tiempos prolongados con ésteres de forbol, se inhibe la fagocitosis; y existe una fuerte correlación entre la cantidad de PKC eliminada y los valores de inhibición de la fagocitosis (42). Además, algunos substratos de PKC como MARCKS y MacMARCKS y la plecstrina se acumulan en el área perifagosomal durante la fagocitosis mediada por los $Fc\gamma R$ (43). Aunque la actividad de PKC es necesaria para que se lleve a cabo la fagocitosis, todavía no es claro el papel de cada isoforma en el proceso. Tanto isoformas de PKC clásicas (α y β) como nuevas (ϵ) se translocan a la membrana durante la fagocitosis mediada por $Fc\gamma R$. Sin embargo, la fagocitosis procede normalmente en ausencia de señales de Ca^{2+} . Se ha sugerido que las isoformas clásicas de PKC participan en el estallido respiratorio inducido por $Fc\gamma R$ s, pues al depletar la célula de Ca^{2+} este proceso se inhibe pero no la fagocitosis. Se ha postulado que son las isoformas de PKC nuevas las que participan en la fagocitosis mediada por los $Fc\gamma R$, pues este proceso es independiente de Ca^{2+} y sensible al tratamiento con ésteres de forbol (44).

Regulación negativa de la señalización por MIRRS

La activación de células a través de receptores que expresan ITAMs es en muchos casos regulada por receptores que expresan motivos de inhibición basados en tirosina de inmunoreceptores (ITIMs). El ITIM fue descrito por vez primera en los receptores $Fc\gamma RIIb$ (45), pero posteriormente se demostró que su distribución es amplia. Los receptores inhibitorios de la citotoxicidad de células NK son un grupo creciente de receptores que restringen la muerte de células blanco que expresan proteínas MHC de clase I específicas, también contienen ITIMs. En el ratón, un grupo de receptores inhibitorios de citotoxicidad pertenecen a la familia de las lectinas diméricas Ly-49, tienen un ITIM e inhiben la citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por el $Fc\gamma RIII$ en células asesinas naturales (NK). Un grupo de receptores inhibitorios en humanos (KIRs) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, tienen dos ITIM, y funcionan como receptores inhibitorios tanto en células NK como en células T. El CD22 es una proteína perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en células B y tiene tres ITIM. La agregación de esta molécula causa una fuerte señal inhibitoria en la estimulación de las células B. Las proteínas gp49B1y MAFA son moléculas transmembranales que se encuentran en células mastoides e inhiben la degranulación inducida por $Fc\epsilon RI$. La proteína gp49 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y contiene dos ITIM. MAFA pertenece a la superfamilia de las lectinas y solo contiene uno.

En muchos casos, incluyendo a los receptores $Fc\gamma R$ s, el receptor con ITIM reconoce el mismo ligando que el receptor que expresa ITAM, regulando directamente la activación. Al igual que los ITAM, los ITIMs son fosforilados por cinasas de la familia Src, pero en estos casos el ITIM fosforilado recluta proteínas con actividad de fosfatasa, incluyendo las fosfatasas de tirosina SHP-1 y SHP-2, así como la fosfatasa de fosfolípidos SHIP. Las fosfatasas de tirosina SHP-1 y SHP-2 desfosforilan los ITAM y otras proteínas de la cascada de señalización, mientras que SHIP actúa sobre los fosfolípidos de inositol producidos por la vía de la PI3-K (revisado en 1).

Modulación de la señalización por receptores $Fc\gamma R$ por el estado de activación/diferenciación de la célula

Aunque se ha logrado dilucidar de manera general el mecanismo bioquímico por el cual las isoformas activadoras de los $Fc\gamma R$ s median la activación celular, y se han identificado un gran número de moléculas que intervienen en las vías de señalización intracelular que pueden ser

activadas por la señalización a través de Fc γ Rs, no se ha estudiado con detalle la influencia de diferentes factores sobre este mecanismo y por lo tanto sobre la respuesta celular. Algunos de los factores que podrían influenciar de manera importante la transducción de señales y la respuesta celular son el número de receptores agregados, la relación entre distintas isoformas activadoras e inhibitoras de Fc γ Rs en los agregados, factores conformacionales relacionados con el ligando entrecruzante, la estimulación simultánea de las células por otros receptores, y el estado de diferenciación de la célula en la que se expresan los receptores. El contexto celular en el que se encuentre el ITAM (tipo celular y su estado de diferenciación o activación) puede ser determinante para la composición de los complejos de traducción de señales. Aun entre células de un mismo linaje en diferentes estados de diferenciación o de activación, existen diferencias cualitativas y cuantitativas en la expresión de muchas proteínas. Si existen diferencias en los niveles de expresión de las proteínas que se unen a los ITAM y otras proteínas que intervienen en la cascada de señalización, las vías bioquímicas de activación pueden ser moduladas de manera diferente, dando lugar a respuestas celulares diferentes.

En nuestro laboratorio, llevamos varios años estudiando la influencia del estado de diferenciación/activación de células del sistema fagocítico mononuclear, sobre las vías de señalización a través de los Fc γ Rs. El sistema de fagocitos monoculares incluye a macrófagos, células dendríticas, monocitos y sus precursores de médula ósea. Los monocitos se originan en la médula ósea a partir de un progenitor mielóide común que comparten con los neutrófilos. Una vez formados, los monocitos son liberados a la sangre permaneciendo en circulación entre 7 y 10 días antes de entrar a los tejidos y diferenciarse en macrófagos o células especializadas como las células dendríticas o los osteoclastos. Los monocitos maduros constituyen 5-10% de los leucocitos de sangre periférica en humanos y su morfología es muy heterogénea respecto a tamaño, grado de granularidad y morfología nuclear. En diferentes mamíferos, entre ellos humanos, ratones, ratas y cerdos se ha encontrado heterogeneidad en la expresión de marcadores de superficie de los monocitos, lo que ha llevado a definir subpoblaciones de monocitos sanguíneos: los monocitos CD14^{hi}CD16⁺CD64⁺ (también llamados monocitos *clásicos* por ser los que poseen la mayoría de las características originalmente descritas para los monocitos) que expresan mayor cantidad de CCR2 y CD62L; monocitos CD14⁺CD16⁺CD64⁻ que expresan mayor cantidad de MHC II, CD86 y CCR5 (que han sido llamados monocitos *“residentes”*); y monocitos CD14⁺CD16⁺CD64⁺ que tienen una gran expresión de CD86 y HLA-DR. El tercer subtipo, con el fenotipo CD14⁺CD16⁺CD64⁺ parece combinar características tanto de monocitos como de células dendríticas y se considera un fenotipo *intermedio*. Al igual que los clásicos, los monocitos CD14⁺CD16⁺CD64⁺ tienen una alta actividad fagocítica y producen grandes cantidades de citocinas, cosa que los monocitos residentes no hacen. Lo que tienen en común con éstos últimos es que tienen una gran capacidad estimuladora de linfocitos T. A partir de estudios en ratón y humanos, se ha empezado a definir un esquema (46) según el cual los monocitos salen de la médula ósea a circulación con el fenotipo clásico. En ausencia de un proceso inflamatorio, adquieren el fenotipo intermedio entre el clásico y el residente. Tanto los monocitos de fenotipo clásico como intermedio pueden responder a señales inflamatorias migrando a tejidos en los que haya procesos inflamatorios en curso, y diferenciarse ahí en macrófagos inflamatorios. En ausencia de procesos inflamatorios, los monocitos sufren una alteración de su fenotipo hacia el fenotipo residente, los cuales pueden transmigrar a los tejidos para renovar las poblaciones de macrófagos y DCs residentes en tejidos. Los monocitos que son reclutados a sitios inflamatorios adquieren en el tejido inflamado un fenotipo particular al modular positiva o negativamente algunas de sus funciones. A este cambio fenotípico se le conoce como activación del macrófago.

Una serie de experimentos *in vitro* ha llevado a considerar que durante un proceso inflamatorio la presencia de distintos productos microbianos y de distintas citocinas secretadas por células propias, puede conferir a los macrófagos un tipo particular de activación (revisado en 47). Los distintos tipos de activación incluyen a la *activación clásica* que se logra por medio de IFN- γ □ y LPS, y se asocia con alta actividad microbicida, producción de citocinas proinflamatorias e inmunidad celular. Un ambiente de citocinas distinto puede inducir al macrófago a

un estado de *activación alternativa* que resulta del cultivo con IL-4 o IL-13 y se asocia con reparación tisular e inmunidad humoral. Asimismo, se ha postulado un tipo distinto de activación, *activación innata*, que es mediada por la ocupación de los Receptores similares a Toll (TLRs) por sus ligandos, y se asocia con actividad microbicida y producción de citocinas pro-inflamatorias. Se ha propuesto también un tipo distinto de activación, la *desactivación*, que es inducida en presencia de IL-10 y TGF- β o por unión de ligandos a los receptores inhibidores CD200 o CD172a, y se asocia con producción de citocinas anti-inflamatorias y reducción de expresión de moléculas de clase II del MHC. A pesar de la clasificación en los distintos estados de activación que se han postulado, el grado de plasticidad que puede haber en la activación es todavía incierto. No se sabe, por ejemplo, si el destino de los macrófagos se define en una sola ocasión o si es susceptible de ser modificado, y también se desconoce si los diferentes estados de activación que se han descrito *in vitro* existen como tales *in vivo*, o si más bien, cada macrófago puede mostrar estados de activación dentro de un rango mucho más amplio, lo que es muy probable debido a que en un ambiente inflamatorio el macrófago puede estar expuesto a una gran variedad de estímulos.

Así, es claro que las células del sistema fagocítico mononuclear pueden existir en un amplio rango de estados de maduración/activación distintos con fenotipos distintos (48). Es posible que los procesos de maduración/activación afecten la activación de funciones efectoras, tanto como consecuencia de cambios en la expresión de receptores en membrana, como por efectos sobre la expresión de proteínas intracelulares involucradas en la señalización. En el caso de la señalización por Fc γ Rs, aparte de posibles cambios en la expresión en membrana de los distintos tipos de Fc γ Rs, la diferenciación puede modificar las concentraciones relativas de proteínas capaces de interactuar con los ITAMs fosforilados, lo cual puede ser determinante para la composición de los complejos de traducción de señales.

Para analizar la hipótesis de que el estado de maduración de la célula monocítica modula la señalización a través de receptores Fc γ R, hemos estudiado los eventos iniciales de la vía de transducción de señales en dos modelos experimentales: células monocíticas de la línea celular THP-1 inducidas a diferenciación con 1 α ,25-dihidroxi-Vitamina D3 (VD3), y células promonocíticas de la línea U-937 diferenciadas con el mismo agente. En ambos casos, hemos demostrado que la diferenciación inducida por VD3 afecta, de manera distinta en cada línea celular, los mecanismos de transducción de señales a través de los Fc γ R (49, 50). Nuestros datos han corroborado que la señalización inducida a través de Fc γ Rs en fagocitos mononucleares no solo depende de la cantidad de receptores agregados, sino que depende del estado de activación de la célula.

Referencias

1. Daëron M. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234.
2. Ravetch J, Kinet J. (1991). *Ann. Rev. Immunol.* 9: 457-492
3. Davis R.S., G. Dennis Jr., M.R. Odom, A.W. Gibson, R.P. Kimberly, P.D. Burrows and M.D. Cooper. (2002) *Immunol. Rev.* 190, 123–136.
4. L.V. Mechetina, A.M. Najakshin, B.Y. Alabyev, N.A. Chikaev and A.V. Taranin (2002) *Immunogenetics* 54, 463–468
5. Nimmerjahn F., Bruhns P., Horiuchi K. and J. Ravetch (2005) *Immunity* 23, 41–51.
6. Kinet, J.P., (1989) *Cell* 57, 351-354.
7. Ravetch, J.V., and Anderson, C.L. (1990). In: *Fc Receptors and the action of antibodies* (H. Metzger, Ed.) American Society for Microbiology, Washington, D.C. 211-235.
8. Hutchinson, M.J., Harrison, P.T., Floto, R.A. and Allen, J.M. (1995) *Eur. J. Immunol.* 25, 481-487.
9. Segal, D.M. (1990) In: *Fc Receptors and the action of antibodies* (H. Metzger, Ed.) American Society for Microbiology, Washington, D.C. 291-301.
10. Ernst, L.K., Van Der Winkel, G.J. Chiu, I.M., Anderson, C.L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 15692-15700.
11. Ernst, L.K., Duchemin, A., and Anderson, C.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90,6023-6027.

12. Santana, C., Noris G., Espinoza B., and Ortega E. (1996) *J. Leuk. Biol.* 60, 433-440.
13. Hibbs, M.L., Bonadonna, L., Scott B.M., McKenzie, I.F., Hogarth, P.M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 2240-2244.
14. D'Ambrosio, D., Hippen, K.L., Miskoff, S.A., Mellman, I., Pani, G., Siminovitch, K.A., and Cambier, J.C. (1995) *Science* 268, 293-297.
15. Weinshank, R.L., Luster, A.D., Ravetch, J.V. (1988). *J. Exp. Med.* 167, 1909-1925.
16. Masuda, M., Verhoeven, A.J., and Roos, D. (1993) *J. Immunol.* 151,6382-6388.
17. Bonnerot, C., Amigorena, S., Choquet, D., Pavlovich, R., Choukroun, V., y Fridman, W.H. (1992) *EMBO J.* 11, 2747-2757.
18. Keegan, D. K., y Paul, W.E. (1992) *Immunol. Today* 13, 63-68.
19. Cambier, J.C. (1995) *Immunol. Today* 16, 110.
20. Clark, M.R., Johnson, S.A. and Cambier, J.C. (1994) *EMBO J.* 13, 1911-1919.
21. Kihara, H. and Siraganian, R.P. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 22427-22432.
22. Ortega, E. (1995) *Mol. Immunol.* 32, 941-945.
23. Love P.E., and Shores E.W. (2000) *Immunity* 12, 591-597.
24. Colucci F, Turner M, Schweighoffer E, Guy-Grand D, Di Bartolo V, Salcedo M, Tybulewicz VL, Di Santo JP. (1999) *J. Immunol.* 163, 1769-1774
25. Fitzer-Attas C.J., Lowry M., Crowley M.T., Finn A.J., Meng F., DeFranco A.L., Lowell C.A. (2000) *J. Exp. Med.* 191, 669-682
26. Ravetch J.V. and Bolland S. (2001) *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290
27. Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, DeFranco AL. (1997) *J. Exp. Med.* 186, 1027-1039.
28. Toker A, Cantley LC. (1997). *Nature* 387: 673-676.
29. Kapeller R, Cantley LC. (1994). *Bioessays* 16, 565-576.
30. Cox D, Tseng C-C, Gordana B, Greenberg S. (1999). *J. Biol. Chem.* 274, 1240-1247
31. Didichenko SA, Tilton B, Hemmings BA, Ballmer-Hofer K, Thelen M. (1996). *Curr. Biol.* 6:1271-1278.
32. Lennartz MR. (1999). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 415-430
33. Cox D, Berg JS, Cammer M, Chingwundoh JO, Dale BM, Cheney RE, Greenberg S. (2002). *Nat Cell Biol* 4, 469-477
34. Marshall CJ. (1995). *Cell.* 80, 179-185.
35. Coxon PY, Rane MJ, Pwell DW, Klein JB, McLeish Kenneth R. (2000). *J. Immunol.* 164: 6530-6537.
36. Grammer TC, Blenis J. (1997) *Oncogene* 14, 1635-1642.
37. Wilson NJ, Jaworowski A, Ward AC, Hamilton JA. (1998). *Bioch. Biophys. Res Comm.* 244, 475-480.
38. Seger R, Krebs E. (1995). *FASEB J.* 9, 726-735.
39. Lennartz MR, Brown EJ. (1991). *J. Immunol.* 147, 621-626.
40. Suchard S.J., Mansfield P J, Boxer L A., Shayman J.A. (1997) *Blood*, 89, 2139-2147.
41. Mansfield PJ, Shayman JA, Boxer LA. (2000). *Blood.* 95: 2407-2412.
42. Zheleznyak A, Brown E.J. (1992). *J. Biol. Chem.* 267: 12042
43. Allen L-AH, Aderem A. (1996) *J. Exp. Med.* 184: 627-637.
44. Zheng L, Zomerdijk TPL, Aarnoudse C, van Furth R, Nibbering PH. (1995). *J. Immunol.* 155: 776
45. Amigorena S, Bonnerot C, Drake JR, Choquet D, Hunziker W, Guillet JG, Webster P, Sautes C, Mellman I, Fridman WH. (1992) *Science* 26, 1808-1812
46. Gordon S y Taylor R. (2005) *Nat. Rev Immunol.* 5, 953-965
47. Gordon S. (2002) *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23-35.
48. Auger MJ. Ross JA. (1992). En: *The Macrophage*, Lewis CE. y McGee J.O'D. (Eds.) IRL Press. USA.
49. Agramonte-Hevia J., Hallal, C., Garay, C., Guerra-Araiza C., Camacho-Arroyo I., y Ortega E. (2003) *J. Cell. Biochem.* 89, 1056-1076
50. Hallal-Calleros C., Agramonte-Hevia J., Garay-Canales C., Oliver J.M., Guerra-Araiza C.; Heras D., Camacho-Arroyo I., Soto-Cruz I., y Ortega E. (2005) *Immunol Letters* 99, 169-179.
51. Boggon TJ y Eck MJ (2004). *Oncogene* 23, 7918-7927.

Semblanza del Dr. Enrique Ortega



Nació en la Ciudad de México en 1956. Estudió la Licenciatura en Q.F.B. y la Maestría en Ciencias Bioquímicas en la Facultad de Química de la UNAM. Obtuvo su doctorado en el Instituto Weizmann de Ciencias en Israel.

Desde su establecimiento como Investigador Titular en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (1991) su línea de investigación principal ha sido la transducción de señales a través de receptores para inmunoglobulinas. Más específicamente ha estudiado la influencia de diversos factores en la generación de las señales bioquímicas intracelulares que median la activación de las células hematopoyéticas por estos receptores. Si bien es aceptado que la agregación de los receptores es el evento que desencadena la cascada de activación, no se tiene claro aún el mecanismo por el cual esta agregación (que no induce cambios conformacionales en el receptor) provoca que enzimas intracelulares (quinasas de tirosina), aumenten su actividad catalítica y fosforilen tanto a cadenas del receptor como a otros sustratos intracelulares. La línea de investigación desarrollada por el Dr. Ortega como investigador independiente ha estado enfocada a definir los factores estructurales (tamaño/conformación/multiplicidad) de los agregados de receptores, y los factores celulares (estado de activación/diferenciación) que influyen en la respuesta celular iniciada por estos receptores. La idea detrás de este enfoque es que el definir con precisión como estos factores modulan o determinan la activación ayudará a entender como la agregación de receptores inicia la cascada de activación.

El Dr. Ortega ha dirigido 10 tesis de Licenciatura, 3 de Maestría y 3 de Doctorado. Además de la dirección de Tesis, ha tenido una participación importante en la docencia a nivel Licenciatura y Posgrado.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LOS PROBLEMAS DE LAS VACUNAS CONTRA ENFERMEDADES Y PATÓGENOS ANTIGENICAMENTE VARIABLES

César Pedroza Roldán, Claudia Charles-Niño y Karen Manoutcharian
Departamento de Biología Moléculas y Biotecnología
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 México, D.F.
E-mail: karman@servidor.unam.mx.

Resumen

El desarrollo de vacunas contra patógenos y enfermedades que muestran una alta variabilidad antigénica representan una gran reto científico. La lista de estos patógenos es larga e incluyen algunos como VIH, malaria, influenza, hepatitis y varias formas de cáncer. A pesar de la aparente diferencia natural de estos patógenos y enfermedades, estos tienen claras similitudes durante la interacción con el sistema inmune del huésped, estas similitudes están dadas por la gran variabilidad de los epítomos debidos a una tasa de mutación elevada lo que posibilita su evolución y adaptación al huésped. Nosotros creemos que la generación de vacunas contra este tipo de enfermedades requerirá al menos una perfecta equivalencia entre la vacuna y el patógeno o enfermedad, lo que proporcionaría una solución universal a los problemas relevantes en el ámbito del desarrollo de vacunas contra patógenos altamente variables.

Palabras clave: Variabilidad antigénica, vacunas.

Abstract

The development of vaccines against antigenically variable pathogens and diseases represents major scientific challenge. The list of such pathogens is large and includes AIDS, malaria, influenza, hepatitis and many forms of cancers. Despite seemingly different nature of these diseases and infections, they have clearly similar features regarding the interaction with the host immune system; the later deal with the huge number of permanently and rapidly evolving epitope variants which undergo evolution and adaptation to the host. We believe that the creation of vaccines against this type of diseases will require almost perfect immunogenic match between vaccine and pathogen/disease and, a systemic solution to relevant problems.

Keywords: Antigenic variability, Vaccines.

Abreviaturas usadas

VIH. Virus de la Inmunodeficiencia Humana, SIDA. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, CPA. Célula presentadora de antígeno, MHC I. Complejo mayor de histocompatibilidad clase I, MHC II. Complejo mayor de histocompatibilidad clase II, CTLs. Células T CD8+ citotóxicas, TCR. Receptor de células T, HLA. Antígeno leucocitario humano.

Introducción

Aunque las vacunas son consideradas como la herramienta más radical en el combate contra las enfermedades, especialmente las infecciosas, existe un contraste dramático entre el pequeño grupo de enfermedades que pueden ser prevenidas por vacunas y el extenso grupo de enfermedades para las cuales no hay vacunas disponibles. La efectividad de las vacunas ha sido demostrada en enfermedades de la niñez; sin embargo, no existen vacunas contra la mayoría de enfermedades como SIDA, cáncer, hepatitis o malaria. El mayor obstáculo para el desarrollo de nuevas vacunas es la variabilidad genética/antigénica de los agentes patógenos o de enfermedades como el cáncer. La variación antigénica ocurre como resultado de la sustitución de aminoácidos y la evolución genética, fenómeno que ha sido descrito para muchos organismos patógenos, incluyendo virus como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), los virus de la hepatitis A/B/C, influenza y dengue; parásitos, como tripanosomiasis africana y malaria. El uso de estrategias tradicionales para el desarrollo de vacunas eficaces tiene claras limitaciones contra las enfermedades mencionadas anteriormente por lo que se requieren acercamientos novedosos y diferentes para tener éxito. Sin duda en este campo tan competitivo se requiere una combinación única de ideas novedosas y técnicas modernas. En la actualidad, los importantes avances en ciencia y tecnología, como en genómica, proteómica, bioinformática, nanotecnología y combinatoria, entre otras, están al servicio del desarrollo de vacunas.

Los retos para el desarrollo de vacunas contra VIH

Según reportes de la Organización Mundial contra el SIDA se ha estimado que hasta el año 2005, 38.6 millones de personas estaban infectadas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Solamente durante el curso del año citado, aproximadamente 4.1 millones de personas resultaron infectadas y 2.8 millones de personas perdieron la vida a causa de SIDA, por lo que la infección por VIH se ha convertido en una epidemia de importancia global (UNAIDS informe sobre la epidemia mundial de SIDA, 2006. <http://www.unaids.org/>). Desde el descubrimiento del VIH se estima que han fallecido más de 20 millones de personas a causa de la inmunodeficiencia generada por este virus. A pesar del gran esfuerzo global para el desarrollo de una vacuna eficaz que pueda prevenir a los individuos contra la infección, hasta hoy no se ha logrado cumplir con este objetivo. Considerando las características únicas de la infección causada por VIH, sólo se puede pensar en desarrollar vacunas terapéuticas, es decir, en vacunas capaces de evitar el desarrollo de SIDA, disminuyendo la carga viral en el hospedero y no en vacunas preventivas que impidan la infección per se. Uno de los principales obstáculos para el desarrollo de una vacuna eficaz es la alta variabilidad antigénica del virus, ocasionada principalmente por la baja fidelidad de la transcriptasa reversa del virus; a pesar de este factor tan importante que impide generar una respuesta inmune protectora, simplemente no existe hoy en día algún candidato a vacuna que lo considere adecuadamente.

Un elemento preponderante de la respuesta inmune contra la infección por VIH es la respuesta de las células T, la cual está dada por células CD4+ cooperadoras (T helper cells o "Th") y por células CD8+ citotóxicas (CTLs) activadas. La activación de las células CD4+ ocurre por la interacción con una célula presentadora de antígeno (CPA), esta célula presenta un antígeno procesado en los endosomas en el contexto del complejo de mayor de

histocompatibilidad clase II (MHC II), entonces la célula CD4+ es activada para la secreción de citocinas; estas sustancias a su vez, aumentan la activación de otras poblaciones celulares como las células CTLs y a las células B secretoras de anticuerpos (Fig. 1).

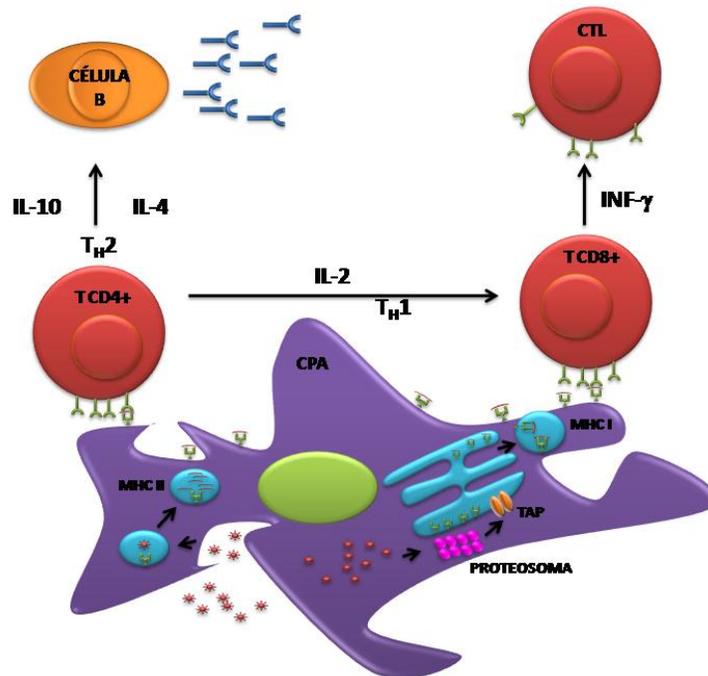


Figura 1. Mecanismos de activación de las células T CD4 y CD8 por una CPA. La toma de agentes extraños del medio extracelular por una CPA permite el procesamiento del antígeno mediante endosomas, una vez procesado éste se presenta en complejo con las moléculas de MHC II (vía endocítica) a células T CD4. Las proteínas citosólicas del huésped o parásitos intracelulares son procesados por el proteosoma celular formando pequeños péptidos de 8 a 12 aminoácidos, estos péptidos son transportados al retículo endoplásmico por la proteína TAP, los péptidos se unen a moléculas de MHC I y son presentados en la superficie celular a células T CD8 (vía citosólica).

La activación inicial de las CTLs ocurre por la interacción con una CPA, que le presenta el antígeno (antígeno activador) procesado en citosol en el contexto del complejo de MHC I. La célula CD8+ activada manifiesta un efecto citotóxico sobre aquellas células que ostentan el antígeno activador, primero las identifica y después las destruye mediante la secreción de enzimas como perforinas y granzimas, o bien a través de la inducción de apoptosis mediada por la interacción de dos moléculas: Fas y Fas-L, presentes en las membranas de la célula efectora y "blanco", respectivamente. La respuesta inmune celular es un medio importante para la reducción de la carga viral en el organismo y la limitación de la aparición del SIDA. La evidencia existente sobre el papel de las CTLs en la contención del virus incluye la disminución de la viremia durante la fase aguda de la infección, que además correlaciona con la aparición de células CTLs específicas, las cuales reconocen epítopos del VIH. Las CTLs tomadas de pacientes infectados con el virus VIH son capaces de inhibir la replicación viral de las células CD4+ infectadas in vitro (1). Jin y cols. (2) demostraron la importancia de las CTLs en la contención de la viremia, utilizando como modelo de estudio macacos infectados con el virus de la Inmunodeficiencia del Simio (VIS). En este trabajo se logró la eliminación de la población celular específica mediante un anticuerpo dirigido contra las células CD8, con lo que lograron reducir la población de las células CD8+ en un 99%; al mismo tiempo, se encontró un incremento de 1 a 3 órdenes de magnitud de la carga viral en el plasma de los 5 monos estudiados. En humanos también se ha demostrado que las células CD8+ específicas contra epítopos derivados

de proteínas de VIH son importantes en la contención de la viremia. Borrow y cols. (3) demostraron, en pacientes que se encontraban en la fase aguda de la infección, la aparición de CTLs específicas contra proteínas derivadas del VIH, como las proteínas Env, Gag, Pol, Nef y Tat. Los pacientes cuyas CTLs demostraron gran actividad contra las proteínas virales mencionadas consiguieron reducir la carga viral significativamente en comparación con un paciente que no generó una respuesta inmune importante. Estos resultados nos hablan de la importancia que tiene la aparición de CTLs específicas y su papel en la contención de la viremia. La contención de la viremia in vivo no sólo está dada por la lisis de las células infectadas que es mediada por las CTLs específicas (4), además se ha observado que las células T CD8+ y CD4+ activadas tienen la capacidad de secretar quimiocinas, las cuales inhiben la entrada del virus al competir por el receptor de las quimiocinas, el CCR5 de las células T CD4+ y el CXCR4 de los macrófagos (1). Por otro lado existen mecanismos reguladores de las células T activadas por los virus tales como las células T reguladoras que ejercen un efecto de disfunción de la respuesta celular durante el curso de la infección, cabe destacar que para esto es necesario una interacción célula-célula (5). Por otro lado, la secreción de citocinas como la IL-10 permite una regulación a distancia (6;7) aunado a esto la activación del ligando PD1 en las células T (8) pareciera permitir una ruta libre para la supervivencia del virus. Estos y otros mecanismos se han comenzado a analizar en individuos con infección por VIH.

La tasa de mutación del VIH se ha determinado en 10^{-4} a 10^{-5} mutaciones por cada ciclo de replicación del genoma viral, lo que implica un gran reto el establecimiento de una respuesta inmune eficaz contra todas las variantes virales generadas en un individuo. En 1991 Phillips RE y cols. (9) encontraron la primera evidencia del escape viral, mediante mutaciones que eliminaban el reconocimiento por células T. i) La generación de mutaciones en un epítipo puede eliminar el reconocimiento de las células T, previamente activadas; este mecanismo es llamado "pecado antigénico original" u Original Antigenic Sin (OAS en inglés) (10;11), ii) la introducción de mutaciones en los aminoácidos relacionados con el anclaje a MHC I disminuye la afinidad del epítipo y en consecuencia éste no es presentado en este contexto (12-14), iii) mutaciones en las regiones que delimitan el epítipo impiden un correcto procesamiento y posiblemente permite la presentación de un epítipo diferente (15;16) (Fig. 2).

Se ha demostrado la aparición de mutaciones que alteran el reconocimiento por CTLs durante la fase de infección primaria. Borrow y cols. (17) demostraron la selección de una mutación en un epítipo inmunodominante de la proteína de envoltura gp160 en un paciente infectado. El paciente eliminó rápidamente la población viral con la que se había infectado y por otro lado, seleccionó una población viral que presentaba una variación de un aminoácido localizado en la posición de anclaje de este epítipo; esta mutación confirió al epítipo la capacidad de no ser reconocido por CTLs específicas para este epítipo. Price y cols. (18) demostraron un fenómeno similar para un epítipo derivado de la proteína Nef: durante la fase aguda de la infección en un individuo infectado, esta mutación disminuía o permitía el escape a la respuesta de las CTLs. Durante la fase crónica de la infección también se ha demostrado que existe una presión de selección de mutantes que elimina el reconocimiento por CTLs. Goulder y cols. (19) realizaron un estudio en diferentes tiempos (estudio longitudinal) en 6 pacientes infectados para un epítipo inmunodominante presentado por el alelo HLA B27 y encontraron que dos de ellos progresaron rápidamente a SIDA. Mediante el análisis del epítipo encontraron que en ambos individuos, una mutación se fijó en la población viral que eliminaba el reconocimiento por CTLs. Una conclusión importante es que las mutaciones de escape de CTLs asociadas con la supresión de la viremia tienden a acumularse dentro de la población viral, y son transmisibles; además, estas mutaciones no reversionan mientras exista una presión de selección constante, tal y como lo demostró Barouch y cols. (20). Esto indica que mientras exista presión de selección sobre determinado epítipo, éste mantendrá las mutaciones puntuales que se reflejan en la población viral. A nivel evolutivo, las poblaciones virales conservan estas mutaciones cuando son sometidas a presión selectiva, y su transmisión se conserva hasta que exista una nueva presión que las revierta o se genere una nueva variante, como se ha demostrado a nivel poblacional en individuos infectados (21).

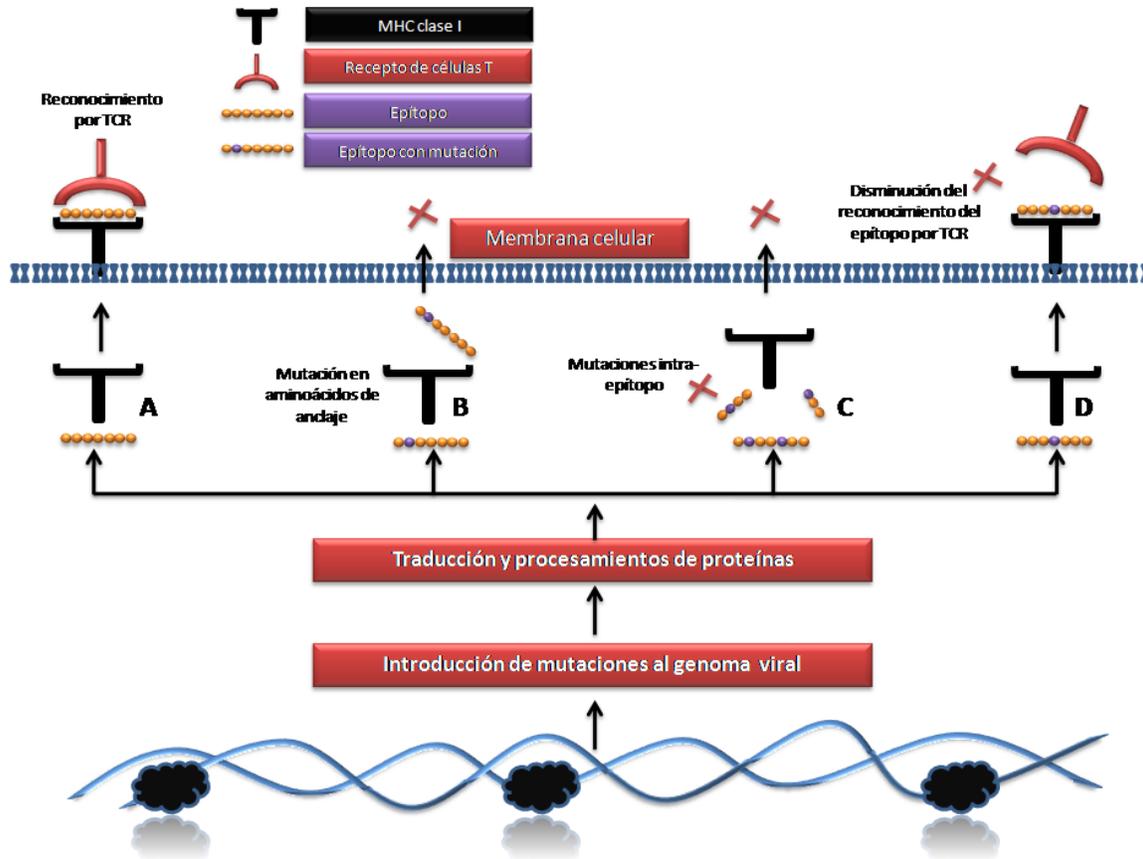


Figura 2. Mecanismos de escape a la respuesta CTL por mutaciones en epítomos. A)

Los epítomos procesados pueden ser presentados por moléculas de MHC I en la superficie de una CPA permitiendo la activación de células T a través de TCR. B) la mutaciones en aminoácidos de anclaje no permiten que el epítopo se una a las moléculas de MHC I por lo tanto no existe la activación de células T. C) algunas mutaciones permiten la desaparición del epítopo debido al procesamiento por proteosoma. D) algunas mutaciones en la región de contacto por TCR disminuyen o eliminan el reconocimiento por el epítopo.

El desarrollo de vacunas que protejan a la población contra la infección es de gran importancia sobre todo en países en desarrollo, donde se concentra la mayor cantidad de individuos infectados. Se ha propuesto que una vacuna contra VIH debe ser capaz de inducir una respuesta tanto humoral como celular (22). Algunas regiones del virus, como el asa V3 de la proteína gp120 son considerados como blancos importantes para la neutralización por anticuerpos (23). Desafortunadamente esta región presenta algunas características que le permiten evadir la respuesta inmune humoral tales como: i) la alta glicosilación de la proteína (24), ii) la generación de anticuerpos contra residuos virales que no representan las conformaciones de las proteínas correctamente ensambladas (25) y el obstáculo principal iii) la alta variación genética de algunas regiones (26). Para enfrentar el reto de la variación antigénica se han propuesto estrategias de construcción de vacunas basándose en secuencias ancestrales, o consenso, con el fin de tratar de cubrir la enorme diversidad de epítomos virales derivados de cepas circulantes de VIH (27-31) Sin embargo, nosotros pensamos que no es el camino correcto porque las secuencias consenso son seleccionadas por el sistema inmune sobre la base de la evolución genética del virus y aunque son conservadas, no son representativas de epítomos vulnerables o protectores ya que literalmente estos epítomos escaparon a la respuesta inmune mediante mutaciones.

La importancia de la protección mediada por células T durante el curso de la infección por VIH ha sido demostrada por diferentes experimentos, como se describió anteriormente. Bajo este criterio, se han desarrollado diferentes inmunógenos que permitan la generación de una respuesta inmune celular específica contra proteínas virales de VIH. Actualmente se encuentran en investigación aproximadamente 35 pruebas clínicas en diferentes fases, la mayoría de ellas en fase I y II. La fase I se caracteriza por la selección de voluntarios ($n \leq 100$) con bajo riesgo de infección, por otro lado la fase II puede dividirse en 2 sub-fases: la fase IIA la cual son individuos de bajo riesgo con una $n \geq 100$ y la fase IIB donde se prueba la eficacia de la vacuna en una muestra menor a 100 individuos con alto riesgo de infección (10).

Dentro de los prototipos de vacunas que se desarrollaron y que se están probando se encuentran las vacunas de ADN plasmídico, además de las del virus "vaccinia ankara" modificado, el virus de la viruela del canario (Canarypox), viruela de aves de corral (Fowlpox), basadas en vectores adenovirales y, más recientemente, las virales adeno-asociadas, las del virus de la encefalitis equina y por último, las basadas en lipo-péptidos derivados de la proteína gp120. Hasta hoy no existe información completa de los resultados de la mayoría de estas pruebas clínicas (10) y, desafortunadamente, nosotros creemos que esas vacunas no tienen oportunidad de éxito por las razones mencionadas anteriormente.

Otros patógenos variables

Otros patógenos como el virus de la hepatitis C, el de la hepatitis B y el virus de la influenza, presentan también una gran variabilidad, que les permite el escape viral como sucede con el VIH. El virus de la Hepatitis C (HCV) presenta una envoltura con un genoma de RNA positivo o codificante. Está clasificado dentro del género Hepacivirus. Se estima que existen aproximadamente 170 millones de personas infectadas alrededor del mundo (32). La carencia de un sistema de corrección de la lectura de la proteína NS5B genera una gran cantidad de mutaciones en el genoma viral (10-5 error/nt) (33). Su tasa de replicación es elevada llegando a generar 1012 partículas virales diarias (34), lo que genera una gran diversidad genética del virus (35). El HCV se ha dividido en 6 grandes grupos con varios subtipos, los cuales difieren aproximadamente en un 35% en las secuencias de nucleótidos del genoma (36). Debido a esta variabilidad antigénica, se ha propuesto la posible relación de escape viral mediante modificaciones en epítopos que impiden que el sistema inmune sea capaz de eliminar todas las variantes esto permite, de la misma forma como sucede con el HIV, una selección tipo Darwiniana (37). La primera evidencia de este fenómeno surgió de los trabajos de Chang (38) y de Frasca(39); ellos observaron que la sustitución de aminoácidos imposibilita el reconocimiento por las células T. En un estudio más reciente se demostró que las mutantes de escape pueden afectar o inhibir la respuesta CD8 inmunodominante en pacientes infectados con el HCV en fase aguda (33). Por otro lado, las CTLs están ejerciendo una presión selectiva positiva contra las variantes de HCV, así que el resultado final, la infección, podría predecirse basándose en las mutaciones en epítopos restringidos por MHC clase I (34). También, ha quedado demostrado que la reactividad cruzada de células T entre la vacuna y epítopos virales es suficiente para suprimir la viremia aguda en chimpancés retados con el HCV heterólogo (35).

Una de las características que se han descrito en varios trabajos es la inmunodominancia hacia ciertos epítopos, lo que permite que el escape viral sea aún más evidente. Para el caso del VIH se ha demostrado que se genera una respuesta mono-funcional contra sólo algunos epítopos y no polifuncional, como sucede con el virus de Epstein-Barr (10;40;41). Un efecto similar sucede durante la infección con el HCV: varios estudios realizados en pacientes han demostrado una activación mono-específica de respuesta de células T contra epítopos virales en fase aguda y crónica de la infección (42). Por otro lado, algunos estudios indican que durante el curso de infección con estos virus, se presenta una limitación en la diversidad de algunas familias del receptor de células T o TCR que se han asociado con el escape viral (43-47). La limitación del repertorio de TCR y el escape viral son consecuencias del

fenómeno llamado inmunidad heteróloga, el cual tiene implicaciones importantes para el diseño de vacunas basadas en epítomos o péptidos (48). El fenómeno de OAS se ha descrito también en pacientes con dengue hemorrágico: se demostró que muchas células T específicas para el virus que está causando la infección son de baja afinidad, mientras que las de alta afinidad están dirigidas contra las cepas encontradas anteriormente (49). La evidencia sugiere que el contacto previo con el antígeno es determinante para que el repertorio de células T surja durante la infección por el virus de la influenza en ratones (50).

Variabilidad antigénica y cáncer

A pesar de muchos debates en el pasado, hoy en día el concepto de la inmunovigilancia contra el cáncer es aceptado; el concepto se basa en la idea de que el sistema inmune es capaz de reconocer y destruir a las células tumorales (51;52). Por otro lado, en pacientes con cáncer se ha observado la influencia que tiene el sistema inmune sobre la naturaleza del tumor, fenómeno denominado "inmuno-edición del cáncer". Este concepto se sustenta en la respuesta inmune tumor-específica tanto humoral como celular. Al parecer los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de utilizar vacunas contra el cáncer, que podrían inducir una respuesta inmune protectora (52). Sin embargo, hasta la fecha no se sabe si la inmuno protección sea posible, por lo que aún no se tienen vacunas eficientes contra el cáncer. Diferentes características de la biología del cáncer plantean verdaderos retos de los cuales no se tienen precedentes y han obstaculizado la obtención de una vacuna eficiente.

El primer reto, que además es el de mayor dificultad, demanda encontrar y seleccionar el componente principal de la vacuna, el antígeno ó inmunógeno; fue así como las primeras vacunas se basaron en líneas celulares derivadas de tumores, muchas de las cuales habían acumulado mutaciones a consecuencia de múltiples pases por cultivo celular. Mediante esta estrategia se obtuvieron vacunas altamente inmunogénicas, además de otras que eran igualmente exitosas en modelos de ratón y que fueron obtenidas de tumores inducidos por carcinógenos que llevan mutaciones únicas. Por otra parte, las células cancerosas completas no son inmunogénicas o lo son en forma muy débil, como en el caso de tumores espontáneos o inducidos (53).

En segundo lugar, se sabe que el cáncer se caracteriza por tener una extrema inestabilidad genética, lo que produce una población celular tumoral heterogénea, compuesta por el efecto adicional que la selección inmune ejerce sobre los fenotipos alejados de las células progenitoras; esta combinación impide el desarrollo exitoso de la inmunoterapia contra el cáncer (54). En tercer lugar, la respuesta inmune periférica está modulada por el complejo microambiente tumoral, que es otro factor importante que impide el desarrollo de una vacuna contra el cáncer. Estos son sólo algunos de los fenómenos relacionados con el cáncer que podrían explicar por qué los resultados clínicos han quedado por debajo de las expectativas durante las pruebas clínicas, en las que la inducción de una respuesta inmune tumor específica ha resultado extraordinariamente exitosa (49-50).

La inestabilidad genómica y la desregulación, que son características de un genoma transformado, pueden resultar en la generación de variantes celulares tumorales inmunoresistentes, las cuales también podrían surgir después de un tratamiento inmunoterapéutico cada vez más efectivo. Existe evidencia experimental clara que apoya la hipótesis del escape tumoral. Tales estudios demuestran que las células tumorales pueden perder o reducir la expresión de la moléculas HLA clase I a través de varios mecanismos, este proceso permite que los péptidos o antígenos tumorales de importancia inmunológica (protectores) no sean presentados a CTLs. Por otro lado, la inestabilidad genómica del las células tumorales permite el establecimiento de jerarquías de epítomos variantes en las subpoblaciones tumorales lo que al final permite un escape de la respuesta inmune. (55). Por lo tanto el reto actual principal para los investigadores dedicados al desarrollo de vacunas contra el

cáncer, es entender los mecanismos mediante los cuales los tumores se vuelven resistentes a la inmunomodulación; además, se tendrá que encontrar una estrategia de vacunación capaz de inducir una respuesta inmune integral (humoral y celular) que permita el reconocimiento de epítomos en pacientes con cáncer antígeno-positivos.

Hay un reporte interesante de un paciente con metástasis secuencial de melanoma, quien pudo responder con células T espontáneamente a variantes "editadas" de antígenos de cáncer (56). Es interesante mencionar que existen retos similares para el desarrollo de vacunas contra SIDA y cáncer: en ambos procesos están involucradas células anormales, malignas o infectadas por el VIH, y la invasión y destrucción de varios tejidos es característica de ambos, junto con la latencia, producción de citocinas y apoptosis, a su vez relacionados con procesos patogénicos; tal vez el punto más íntimamente relacionado con vacunas es la elevada tasa de mutaciones, si consideramos que una célula cancerosa tiene 11 mil mutaciones.

Referencias

1. Gandhi, R. T. and Walker, B. D. (2002) *Annu. Rev. Med.* **53**, 149-172
2. Jin, X., Bauer, D. E., Tuttleton, S. E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C. E., Safrit, J. T., Mittler, J., Weinberger, L., Kostrikis, L. G., Zhang, L., Perelson, A. S., and Ho, D. D. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 991-998
3. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., and Oldstone, M. B. (1994) *J. Virol.* **68**, 6103-6110
4. McMichael, A. J. and Phillips, R. E. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 271-296
5. Estes, J. D., Li, Q., Reynolds, M. R., Wietgreffe, S., Duan, L., Schacker, T., Picker, L. J., Watkins, D. I., Lifson, J. D., Reilly, C., Carlis, J., and Haase, A. T. (2006) *J. Infect. Dis.* **193**, 703-712
6. Elrefaei, M., Ventura, F. L., Baker, C. A., Clark, R., Bangsberg, D. R., and Cao, H. (2007) *J. Immunol.* **178**, 3265-3271
7. Elrefaei, M., Barugahare, B., Ssali, F., Mugenyi, P., and Cao, H. (2006) *J. Immunol.* **176**, 1274-1280
8. Day, C. L., Kaufmann, D. E., Kiepiela, P., Brown, J. A., Moodley, E. S., Reddy, S., Mackey, E. W., Miller, J. D., Leslie, A. J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E. J., Coovadia, H. M., Goulder, P. J., Klenerman, P., Ahmed, R., Freeman, G. J., and Walker, B. D. (2006) *Nature* **443**, 350-354
9. Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., Rothbard, J. A., Bangham, C. R. M., Rizza, C. R., and McMichael, A. J. (1991) *Nature* **354**, 453-459
10. McMichael, A. J. (2006) *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 227-255
11. Klenerman, P. and Zinkernagel, R. M. (1998) *Nature* **394**, 482-485
12. Goulder, P. J., Brander, C., Tang, Y., Tremblay, C., Colbert, R. A., Addo, M. M., Rosenberg, E. S., Nguyen, T., Allen, R., Trocha, A., Altfeld, M., He, S., Bunce, M., Funkhouser, R., Pelton, S. I., Burchett, S. K., McIntosh, K., Korber, B. T., and Walker, B. D. (2001) *Nature* **412**, 334-338
13. Couillin, I., Connan, F., Culmann-Penciolelli, B., Gomard, E., Guillet, J. G., and Choppin, J. (1995) *Eur. J. Immunol.* **25**, 728-732
14. Couillin, I., Culmann-Penciolelli, B., Gomard, E., Choppin, J., Levy, J. P., Guillet, J. G., and Saragosti, S. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 1129-1134
15. Allen, T. M., Altfeld, M., Yu, X. G., O'Sullivan, K. M., Lichterfeld, M., Le, G. S., John, M., Mothe, B. R., Lee, P. K., Kalife, E. T., Cohen, D. E., Freedberg, K. A., Strick, D. A., Johnston, M. N., Sette, A., Rosenberg, E. S., Mallal, S. A., Goulder, P. J., Brander, C., and Walker, B. D. (2004) *J. Virol.* **78**, 7069-7078
16. Draenert, R., Le, G. S., Pfafferott, K. J., Leslie, A. J., Chetty, P., Brander, C., Holmes, E. C., Chang, S. C., Feeney, M. E., Addo, M. M., Ruiz, L., Ramduth, D., Jeena, P., Altfeld, M., Thomas, S., Tang, Y., Verrill, C. L., Dixon, C., Prado, J. G., Kiepiela, P., Martinez-Picado, J., Walker, B. D., and Goulder, P. J. (2004) *J. Exp. Med.* **199**, 905-915
17. Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Pfeffer, N., Meyers, H., Nelson, J. A., Gairin, J. E., Hahn, B. H., Oldstone, M. B., and Shaw, G. M. (1997) *Nat. Med.* **3**, 205-211
18. Price, D. A., Goulder, P. J., Klenerman, P., Sewell, A. K., Easterbrook, P. J., Troop, M., Bangham, C. R., and Phillips, R. E. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1890-1895
19. Goulder, P. J., Phillips, R. E., Colbert, R. A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M. A., Giangrande, P., Luzzi, G., Morgan, B., Edwards, A., McMichael, A. J., and Rowland-Jones, S. (1997) *Nat. Med.* **3**, 212-217

20. Barouch, D. H., Powers, J., Truitt, D. M., Kishko, M. G., Arthur, J. C., Peyerl, F. W., Kuroda, M. J., Gorgone, D. A., Lifton, M. A., Lord, C. I., Hirsch, V. M., Montefiori, D. C., Carville, A., Mansfield, K. G., Kunstman, K. J., Wolinsky, S. M., and Letvin, N. L. (2005) *Nat. Immunol.* **6**, 247-252
21. Leslie, A. J., Pfafferoth, K. J., Chetty, P., Draenert, R., Addo, M. M., Feeney, M., Tang, Y., Holmes, E. C., Allen, T., Prado, J. G., Altfeld, M., Brander, C., Dixon, C., Ramduth, D., Jeena, P., Thomas, S. A., St, J. A., Roach, T. A., Kupfer, B., Luzzi, G., Edwards, A., Taylor, G., Lyall, H., Tudor-Williams, G., Novelli, V., Martinez-Picado, J., Kiepiela, P., Walker, B. D., and Goulder, P. J. (2004) *Nat. Med.* **10**, 282-289
22. Letvin, N. L. (2005) *Annu. Rev. Med.* **56**, 213-223
23. Pantophlet, R. and Burton, D. R. (2006) *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 739-769
24. Calarese, D. A., Lee, H. K., Huang, C. Y., Best, M. D., Astronomo, R. D., Stanfield, R. L., Katinger, H., Burton, D. R., Wong, C. H., and Wilson, I. A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 13372-13377
25. O'Connor, D. H. and Burton, D. R. (2006) *J. Exp. Med.* **203**, 501-503
26. McMichael, A. J. and Phillips, R. E. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 271-296
27. Weaver, E. A., Lu, Z., Camacho, Z. T., Moukdar, F., Liao, H. X., Ma, B. J., Muldoon, M., Theiler, J., Nabel, G. J., Letvin, N. L., Korber, B. T., Hahn, B. H., Haynes, B. F., and Gao, F. (2006) *J. Virol.* **80**, 6745-6756
28. Liao, H. X., Sutherland, L. L., Xia, S. M., Brock, M. E., Searce, R. M., Vanleeuwen, S., Alam, S. M., McAdams, M., Weaver, E. A., Camacho, Z., Ma, B. J., Li, Y., Decker, J. M., Nabel, G. J., Montefiori, D. C., Hahn, B. H., Korber, B. T., Gao, F., and Haynes, B. F. (2006) *Virology* **353**, 268-282
29. Kothe, D. L., Decker, J. M., Li, Y., Weng, Z., Bibollet-Ruche, F., Zammit, K. P., Salazar, M. G., Chen, Y., Salazar-Gonzalez, J. F., Moldoveanu, Z., Mestecky, J., Gao, F., Haynes, B. F., Shaw, G. M., Muldoon, M., Korber, B. T., and Hahn, B. H. (2006) *Virology*
30. Kothe, D. L., Li, Y., Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Zammit, K. P., Salazar, M. G., Chen, Y., Weng, Z., Weaver, E. A., Gao, F., Haynes, B. F., Shaw, G. M., Korber, B. T., and Hahn, B. H. (2006) *Virology* **352**, 438-449
31. Gao, F., Korber, B. T., Weaver, E., Liao, H. X., Hahn, B. H., and Haynes, B. F. (2004) *Expert. Rev. Vaccines.* **3**, S161-S168
32. Shoukry, N. H., Cawthon, A. G., and Walker, C. M. (2004) *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 391-424
33. Ogata, N., Alter, H. J., Miller, R. H., and Purcell, R. H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 3392-3396
34. Herrmann, E., Neumann, A. U., Schmidt, J. M., and Zeuzem, S. (2000) *Antivir. Ther.* **5**, 85-90
35. Thimme, R., Lohmann, V., and Weber, F. (2006) *Antiviral Res.* **69**, 129-141
36. Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J., and Widell, A. (2005) *Hepatology* **42**, 962-973
37. Thimme, R., Lohmann, V., and Weber, F. (2006) *Antiviral Res.* **69**, 129-141
38. Chang, K. M., Rehmann, B., McHutchison, J. G., Pasquinelli, C., Southwood, S., Sette, A., and Chisari, F. V. (1997) *J. Clin. Invest* **100**, 2376-2385
39. Frasca, L., Del, P. P., Tuosto, L., Marinari, B., Scotta, C., Carbonari, M., Nicosia, A., and Piccolella, E. (1999) *J. Immunol.* **163**, 650-658
40. Yu, X. G., Addo, M. M., Rosenberg, E. S., Rodriguez, W. R., Lee, P. K., Fitzpatrick, C. A., Johnston, M. N., Strick, D., Goulder, P. J., Walker, B. D., and Altfeld, M. (2002) *J. Virol.* **76**, 8690-8701
41. Goulder, P. J., Brander, C., Annamalai, K., Mngqundaniso, N., Govender, U., Tang, Y., He, S., Hartman, K. E., O'Callaghan, C. A., Ogg, G. S., Altfeld, M. A., Rosenberg, E. S., Cao, H., Kalams, S. A., Hammond, M., Bunce, M., Pelton, S. I., Burchett, S. A., McIntosh, K., Coovadia, H. M., and Walker, B. D. (2000) *J. Virol.* **74**, 5679-5690
42. Bowen, D. G. and Walker, C. M. (2005) *Nature* **436**, 946-952
43. Kalams, S. A., Johnson, R. P., Trocha, A. K., Dynan, M. J., Ngo, H. S., D'Aquila, R. T., Kurnick, J. T., and Walker, B. D. (1994) *J. Exp. Med.* **179**, 1261-1271
44. Meyer-Olson, D., Shoukry, N. H., Brady, K. W., Kim, H., Olson, D. P., Hartman, K., Shintani, A. K., Walker, C. M., and Kalams, S. A. (2004) *J. Exp. Med.* **200**, 307-319
45. Gillespie, G. M., Stewart-Jones, G., Rengasamy, J., Beattie, T., Bwayo, J. J., Plummer, F. A., Kaul, R., McMichael, A. J., Easterbrook, P., Dong, T., Jones, E. Y., and Rowland-Jones, S. L. (2006) *J. Immunol.* **177**, 3893-3902
46. Chen, Z. W., Li, Y., Zeng, X., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Shen, Y., Lai, X., Shen, L., and Letvin, N. L. (2001) *J. Immunol.* **166**, 4525-4533
47. Bowen, D. G. and Walker, C. M. (2005) *J. Exp. Med.* **201**, 1709-1714

48. Cornberg, M., Chen, A. T., Wilkinson, L. A., Brehm, M. A., Kim, S. K., Calcagno, C., Ghersi, D., Puzone, R., Celada, F., Welsh, R. M., and Selin, L. K. (2006) *J. Clin. Invest* **116**, 1443-1456
49. Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. N., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S., Yenchitsomanus, P. T., McMichael, A., Malasit, P., and Screaton, G. (2003) *Nat. Med.* **9**, 921-927
50. Haanen, J. B., Wolkers, M. C., Kruisbeek, A. M., and Schumacher, T. N. (1999) *J. Exp. Med.* **190**, 1319-1328
51. Rosenberg, S. A. (1999) *Immunity*. **10**, 281-287
52. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 991-998
53. Finn, O. J. (2003) *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 630-641
54. Marincola, F. M., Wang, E., Herlyn, M., Seliger, B., and Ferrone, S. (2003) *Trends Immunol.* **24**, 335-342
55. Khong, H. T. and Restifo, N. P. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 999-1005
56. Yamshchikov, G. V., Mullins, D. W., Chang, C. C., Ogino, T., Thompson, L., Presley, J., Galavotti, H., Aquila, W., Deacon, D., Ross, W., Patterson, J. W., Engelhard, V. H., Ferrone, S., and Slingluff, C. L., Jr. (2005) *J. Immunol.* **174**, 6863-6871

Semblanza del Dr. Karen Manoutcharian



En 1991 el Dr. Karen Manoutcharian recibió su título de doctorado en Biología Molecular, en el Instituto de Genética Molecular en Moscú, Rusia. La principal línea de investigación del Dr. Manoutcharian es la Inmunotecnología Molecular, particularmente en la aplicación de biomoléculas expresadas en la superficie de fagos filamentosos (*phage display*) para el desarrollo de vacunas recombinantes y de moléculas inmuno-reativas, útiles en el diagnóstico clínico. Como ejemplo de lo anterior, el grupo del Dr. Manoutcharian se encuentra desarrollando vacunas recombinantes contra la cisticercosis. Han identificado genes del parásito *Taenia crassiceps* a partir de bibliotecas de expresión de DNAC para utilizarse posteriormente en el desarrollo de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos. Se pretende que estos productos sean utilizados como posibles vacunas, o para el diagnóstico de la Neurocisticercosis (NCC).

El grupo del Dr. Manoutcharian desarrolló recientemente un nuevo método de vacunación génica denominado como "Inmunización con bibliotecas de expresión de DNAC" (cDELI). Este método se aplicó exitosamente en un modelo de cisticercosis murina. En la actualidad el Dr. Manoutcharian y su grupo han empleado ampliamente la técnica de *phage display* para la identificación de características particulares de muestras de pacientes con NCC, trombocitopenia o tuberculosis. Además, se encuentra en proceso la identificación de péptidos involucrados en la transducción de señales.

El interés y trayectoria del Dr. Manoutcharian en la búsqueda de trasladar sus descubrimientos a la aplicación en salud, a través del desarrollo de vacunas y del inmunodiagnóstico de diferentes enfermedades, ha sido premiado en distintas ocasiones. En el 2005 Karen recibió el Premio Bialik a la Innovación Tecnológica por su trabajo sobre detección del *Mycobacterium tuberculosis*.

Actualmente el Dr. Manoutcharian es Investigador Titular "B" del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

BIOLOGÍA CELULAR DEL SPLICING

Luis Felipe Jiménez García*, Reyna Lara Martínez, Ivet Gil Chavarría, Alma Leticia Zamora Cura, Martha Salcedo Alvarez¹, Lourdes Teresa Agredano Moreno, José de Jesús Moncayo Sahagún², María de Lourdes Segura Valdez
Laboratorio de Nanobiología Celular, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México D.F. 04510, México.

*lfjg@hp.fciencias.unam.mx

¹Dirección permanente: Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, UNAM

²Dirección permanente: Colegio de Ciencias y Humanidades-Oriente, UNAM

Resumen

La presencia de genes segmentados en eucariontes trae consigo la producción de un transcrito primario o pre-mRNA que tiene que ser procesado para salir al citoplasma en forma de mRNA y ser traducido a proteína por el ribosoma. Los pasos principales de procesamiento son 1) la metilación del extremo 5', 2) la poliadenilación del extremo 3' y 3) el corte de intrones y ligado de los exones o splicing. El splicing es un proceso de transesterificación en dos pasos. En el primero se cortan los sitios de unión intrón-exón y en el segundo se ligan los exones. Para que ocurra la reacción se requieren factores proteicos y varios RNAs. La localización celular de estas moléculas por medio de marcaje y el uso de los microscopios de epifluorescencia y confocal, revela la presencia de los factores de splicing en una distribución conocida como patrón moteado. Se presenta en células en cultivo, pero también en diferentes tejidos. En ambos casos, la morfología del patrón es muy dinámica, como lo revela el uso de construcciones moleculares con la proteína fluorescente verde y depende de la actividad de transcripción y de splicing de las células. Los componentes ultraestructurales del patrón moteado corresponden a partículas ribonucleoproteicas, descritas con el microscopio electrónico de transmisión desde finales de la década de los años 1950. El patrón moteado intranuclear de factores de splicing es el reflejo morfológico de la actividad de transcripción y splicing.

Palabras clave: mRNA, núcleo, pre-mRNA, proteínas SR, ribonucleoproteínas, speckles, splicing.

Abstract

As a consequence of the presence of split genes in eukaryotes, a primary transcript should be produced and it has to be processed to be exported to the cytoplasm for translation. Major processing events are 1) 5' end methylation, 2) 3' end polyadenylation and 3) splicing. Splicing takes place as two steps of transterification. First, exon-intron junction is broken and then exons are ligated. Protein and RNA factors are required for the reaction. Cellular localization of these molecules by labelling and the use of epifluorescence and confocal microscopy, reveals the presence of splicing factors in a distribution known as speckled pattern. It has been observed in cultured cells but, recently, also in several tissues. In both cases, the morphology of the pattern is very dynamic, as revealed by molecular constructions fusing the green fluorescent protein gene to splicing factors genes and transfecting cells with them to transiently express the factor. The dynamics depend upon transcriptional and splicing activities. Ultrastructural components of the speckled pattern correspond to ribonucleoprotein particles, as previously described using the transmission electron microscope since the late 1950s. The intranuclear speckled pattern for splicing factors is the morphological reflection of transcriptional and splicing activities.

Keywords: mRNA, nucleus, pre-mRNA, ribonucleoproteins, speckles, splicing. SR proteins.

Introducción

En 1977, Roberts y Sharp encontraron que la secuencia nucleotídica de los genes de adenovirus 2 (Ad2) contenía segmentos de DNA con información para la producción de proteínas (codificantes), alternadas con secuencias que no contenían información para ello (no codificantes); es decir, los genes de estos virus estaban segmentados, partidos o arreglados en mosaico (*split genes*) [1-2]. Como consecuencia, los transcritos primarios de estos genes se producían como moléculas grandes que requerían ser cortadas para eliminar los segmentos no codificantes y ligar los segmentos codificantes. A este proceso se le denominó *splicing*. Así, el RNA mensajero (mRNA) producido a partir de esos genes tenía un tamaño menor que la misma secuencia del cual era copiado. Estos datos permitieron ofrecer una explicación para las observaciones de Darnell de principios de la década de los años 60's, de que el RNA nuclear era de mayor tamaño (el RNA gigante, gRNA) que el del citoplasma [3]. Rápidamente, estos resultados fueron confirmados por Pierre Chambon, también para los genes de mamíferos, lo que más adelante culminó en la generalización de una organización similar para los eucariontes. En 1978, Walter Gilbert propuso utilizar el término exón para las regiones que se expresan e intrón para las que son intermedias o interrumpen la lectura del mensaje genético (llamadas secuencias intermedias, *intervening sequences* o IVS) [4].

Actualmente, se conoce que los genes de eucariontes están segmentados, lo que lleva a la producción de un transcrito primario de igual tamaño que el gen, llamado RNA pre-mensajero (pre-mRNA) o RNA heterogéneo nuclear (hnRNA). Esos transcritos son procesados o madurados en tres reacciones principales que son:

a) La metilación en el extremo 5', que consiste en la adición del grupo trifosfatado 7-metilguanosa, denominado *cap*, que es necesario para la unión al ribosoma al momento de la traducción.

b) La poliadenilación en el extremo 3', que se refiere a la adición de adeninas en todos los mRNAs excepto en los de las histonas, llamada cola de poli A, la cual está formada por una secuencia de aproximadamente 50 a 250 nucleótidos. Evita la degradación del RNA

c) El *splicing*, es el proceso mediante el cual se eliminan las secuencias no codificantes o intrones (escindiéndolos del pre-mRNA) y se unen o empalman los exones para generar el RNA mensajero maduro o mRNA.

En este trabajo trataremos el tema del *splicing* y nos limitaremos al *splicing* del pre-mRNA, dejando por ahora de lado los otros dos tipos de *splicing* autocatalíticos, como por ejemplo el auto-*splicing* de *Tetrahymena*.

Biología molecular del *splicing*

El *splicing* ocurre en dos pasos de transesterificación

El *splicing* es un proceso que químicamente consiste de dos reacciones sucesivas de transesterificación. El corte y el empalme son dependientes de la hidrólisis de ATP y son catalizados por un gran complejo de ribonucleoproteínas llamado "spliceosoma". Este proceso dará como resultado la formación del mRNA, que será transportado al citoplasma y en donde será traducido a proteína en el caso de que ocurra *splicing* constitutivo o bien, a diversas proteínas en el caso de que se lleve a cabo *splicing* alternativo. El *splicing* se lleva a cabo en el núcleo, aunque hay reportes de que también puede ser citoplásmico [5-9].

En la figura 1 se ilustra el proceso del *splicing*. En resumen, el pre-mRNA se forma a partir de un gen segmentado y tiene varios sitios de acción *cis* o elementos de la misma secuencia. Los sitios más conservados son los dinucleótidos GU y AG en los lugares de unión exón-intrón (sitios de *splicing* 5') e intrón y exón (sitios de *splicing* 3'), respectivamente. El punto de empalme (*branchpoint*) es en general una adenina y mantiene una secuencia consenso, al menos para el caso de levaduras. Entre el sitio de empalme y el sitio del dinucleótido AG se encuentra una región rica en pirimidinas (uracilos, usualmente) llamada la región Py. En el primer paso de transesterificación, el grupo OH de la ribosa del residuo de adenina en el sitio de empalme, realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de *splicing* 5', generando una ruptura del enlace fosfodiéster. Al mismo tiempo, la guanina del dinucleótido realiza un enlace a través de su extremo 5' con el lado 2' del residuo de adenina en el sitio de empalme. Después ocurre la segunda reacción de transesterificación, en la cual el grupo OH del extremo del exón realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de *splicing* 3'. Como resultado, se libera el intrón como una estructura en forma de reata o *lariat*, al mismo tiempo que se unen los exones para generar el mRNA maduro. El intrón en forma de *lariat* se rompe nuevamente en su enlace 5'-2' y se lineariza, posibilitando que sea degradado o bien procesado nuevamente para dar lugar a un RNA pequeño nucleolar rico en uracilo (UsnoRNA) [5-8].

El *splicing* requiere varios factores presentes en el spliceosoma.

Para que se lleve a cabo el *splicing* se requieren varios factores, que incluyen diferentes tipos de RNA y proteínas que son:

1) Los RNA pequeños nucleares cuyas longitudes oscilan entre 60 y 300 nucleótidos y son ricos en residuos de uracilo (UsnRNAs). Los cinco tipos son: el U1snRNA, el U2snRNA, el U4snRNA, el U5snRNA y el U6snRNA. El U3snRNA participa en eventos de maduración del pre-rRNA (RNA ribosomal inmaduro o precursor). Estos RNAs son transcritos por la RNA polimerasa II, salvo el U6snRNA, que lo transcribe la RNA polimerasa III. En el núcleo, los UsnRNAs se asocian con proteínas para formar ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (UsnRNPs).

2) Las partículas ribonucleoproteicas heterogéneas nucleares (hnRNPs) que contienen RNA heterogéneo nuclear (hnRNA), son estabilizadoras, es decir, su función radica en asociarse al pre-mRNA para impedir la formación de estructuras secundarias dadas por el apareamiento de bases. De ésta manera el pre-mRNA permanece accesible para interactuar con otras moléculas.

3) Las proteínas SR (proteínas con dominios ricos en Serina y Arginina) representan una familia de factores de *splicing* que se reporta en vertebrados, invertebrados y plantas. La secuencia de aminoácidos en estas proteínas es rica en residuos de serina (S) y arginina (R) en el extremo carboxilo, formando el dominio SR. Estas proteínas tienen varios papeles reguladores en el *splicing*

como son la definición de los sitios de *splicing* y el acercamiento de las regiones de los dinucleótidos. Estas proteínas nucleares de 20 a 75 kDa, tienen capacidad de fosforilarse y se subdividen en: A) De Tipo I, las cuales presentan un solo Motivo de Reconocimiento a RNA (RRM) en el extremo amino-terminal y su dominio SR carboxilo Terminal, y B) de Tipo II, las cuales presentan dos Motivos de Reconocimiento a RNA (RRMs) y un dominio carboxilo terminal SR.

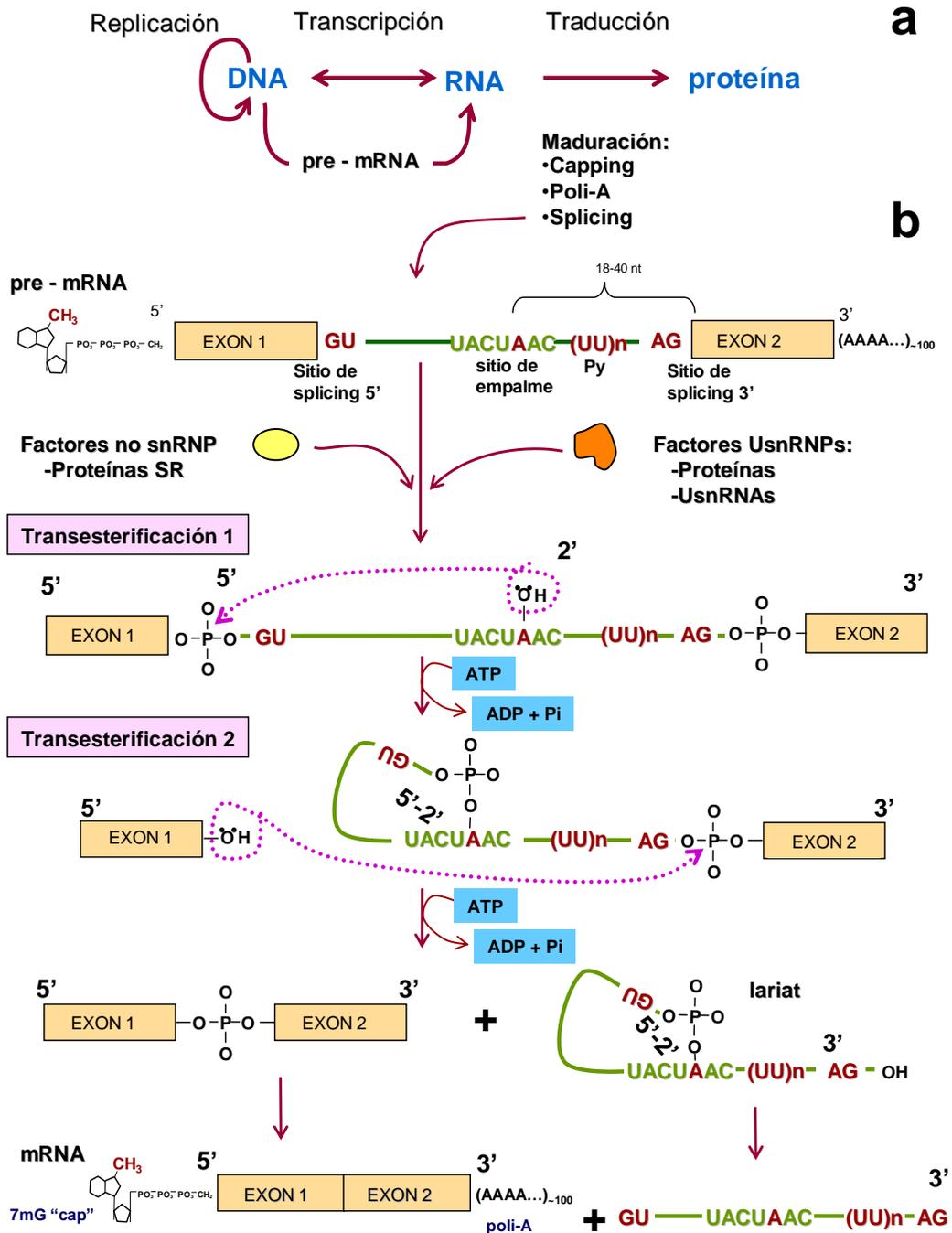


Figura 1. A) Flujo de la información genética. B) La reacción del *splicing* incluye dos pasos de transesterificación, en donde se requiere de ATP. En la reacción se libera el intrón y se ligan los exones.

Además, existen otras proteínas que pueden o no tener una estructura distinta del Motivo de Reconocimiento a RNA (RRM). En las células de mamíferos se han identificado y aislado componentes esenciales del *splicing*, tales como el factor SF2/ASF, el factor SC35 y el 9G8, los cuales han sido identificados por anticuerpos monoclonales [8, 10-30].

La figura 2 muestra los elementos del spliceosoma (a), un esquema de las proteínas SR (b) y el sitio conservado de 20 proteínas de las UsnRNPs (c).

El *splicing* ocurre en complejos

La figura 3 ilustra como los factores de *splicing* interaccionan con el pre-mRNA secuencialmente, formando complejos ribonucleoproteicos transitorios que permitirán que ocurran los dos pasos de transesterificación. En el primer paso se forma el complejo **E**, que se caracteriza por 1) la unión del U1snRNA de la U1snRNP al sitio de *splicing* 5'; este sitio de reconocimiento está dado por una secuencia complementaria de U1snRNA con el sitio de unión exón-intrón, provocando un apareamiento con los primeros seis nucleótidos del intrón, delimitando así el exón 1; 2) la unión del factor U2AF (que tiene el dominio SR) con el sitio Py; 3) la participación en el complejo de los factores SC35, SF2/ASF, SF1/BBP y el U2snRNP. Posteriormente, el complejo **E** se transforma en el complejo **A**, cuando el U2snRNP se une al sitio de empalme. El complejo **B1** se forma luego, cuando se asocia el trímero U4/U5/U6snRNP pre-ensamblado. Así, el U5snRNA se une al sitio de *splicing* 5' y el U6snRNA se une al U2snRNA. Este complejo forma un spliceosoma maduro. Posteriormente se forma el complejo **B2**, en donde se libera el U1snRNA, el U5snRNA se mueve del exón hacia el intrón y el U6snRNA se une al sitio de *splicing* 5'. Este paso se lleva a cabo mediante un apareamiento de aproximadamente 20 bases entre el U1snRNA y el U4snRNA. Como consecuencia, se activa el spliceosoma para llevar a cabo su catálisis. La función de U5snRNA es interactuar con secuencias del exón en el sitio del procesamiento 5' y 3'. El complejo **C1** se forma cuando se libera el U4snRNA y el U5snRNA se une al exón en el sitio de *splicing* 3'. En este punto se cataliza la transesterificación, es decir, se rompe el sitio de *splicing* 5' y se forma el *lariat*. Finalmente se forma el complejo **C2**, que contiene el trímero U2/U5/U6snRNAs, que permite el rompimiento del sitio de *splicing* 3' y se ligan los exones [8, 10-30].

Biología celular del *splicing*

Microscopía de luz de los factores de *splicing* en el núcleo

En células de mamíferos creciendo en cultivo, los anticuerpos contra factores proteicos de *splicing* producen imágenes con el microscopio de epifluorescencia con un patrón en forma de manchas embebidas en un ambiente difuso. Este patrón de tinción es conocido como patrón moteado (*speckled pattern*). Consta de 25 a 50 motas de entre 0.8 a 1.8 μm de tamaño, de forma irregular (Figura 4). Si se utilizan anticuerpos contra factores de *splicing* que forman ribonucleoproteínas, además de ese patrón, se tiñen los cuerpos de Cajal, que son estructuras ribonucleoproteicas de 0.5 μm de diámetro. En estudios de hibridación *in situ* se confirmó que también los RNAs que son factores de *splicing* producen un mismo tipo de tinción intranuclear [31-42]. Las *speckles* son estructuras amorfas que contienen altas concentraciones de snRNPs y proteínas relacionadas con el *splicing*. En células de mamíferos, la composición y localización intranuclear de las *speckles* responden a cambios en la transcripción del mRNA y a la fosforilación de proteínas. Además, contienen varias moléculas con un papel estructural. Los efectos de la fosforilación en las *speckles* y su función son particularmente evidentes en células de mamíferos, lo que sugiere que depende de la fosforilación de la proteína para controlar el estado físico de los *speckles* y su capacidad para proveer de factores de *splicing*. El comportamiento de las *speckles* es dinámico, puesto que varía su estructura y tamaño, además de su forma. Estos pueden variar según los niveles de expresión de genes y a la respuesta metabólica y al ambiente.

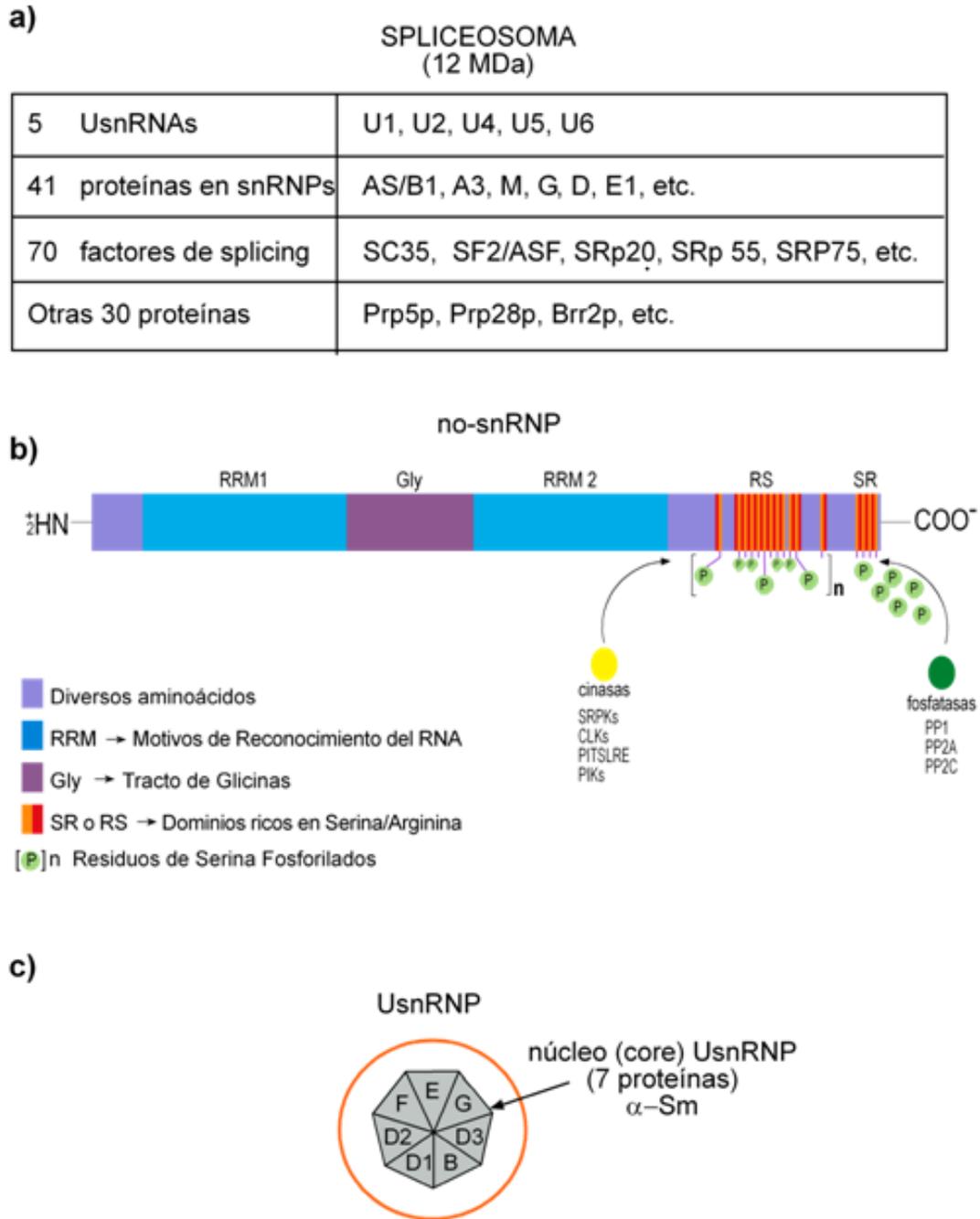


Figura 2. Composición molecular del spliceosoma. La tabla (a) muestra los diferentes elementos proteicos y de RNAs del spliceosoma. En (b) se muestra el esquema genérico de factores de *splicing* no-snRNPs (proteínas SR) con los dominios estructurales que las componen y las cinasas y fosfatasas que los modifican; en (c) se muestran las proteínas comunes a todas las snRNPs excepto el U6, que son reconocidos por los anticuerpos anti- α -Sm. De unas 20 proteínas totales de las USNRNPs, 7 forman el núcleo (*core*).

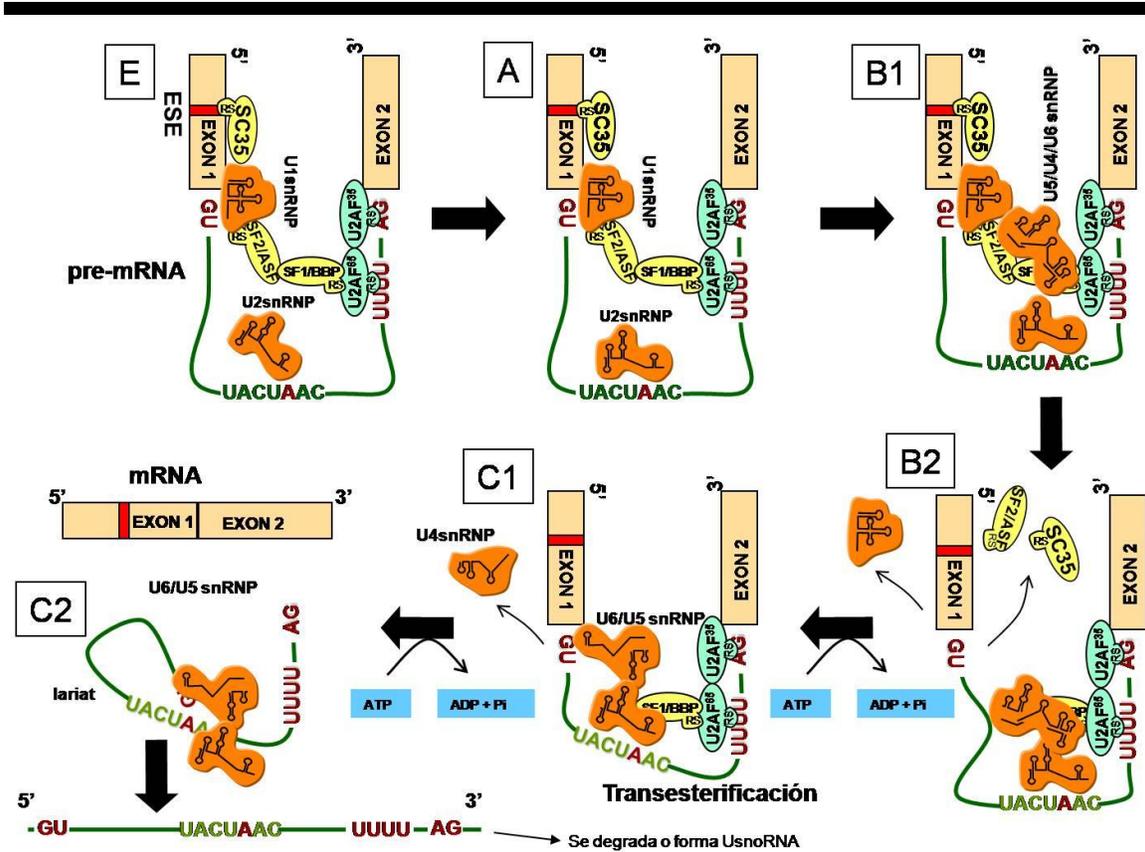


Figura 3. Biología Molecular del *splicing*. El *splicing* ocurre de manera secuencial en varios pasos en el spliceosoma (complejos E→A→B1→B2→C1→C2). Los factores no snRNPs (U2AF^{65/35}, verde), proteínas SR, (amarillo) - ambas con el dominio RS- y los factores snRNP (naranja), participan en el reconocimiento y acercamiento de los sitios de unión intrón-exón, para que ocurran los dos pasos de transesterificación.

Microscopía electrónica de ribonucleoproteínas intranucleares.

Desde que se empezó utilizar el microscopio electrónico para el análisis fino de células, la estructura nuclear mostró una complejidad mucho mayor que la observada con el microscopio de luz. En particular en 1969, Bernhard inventó un método de contraste ultraestructural que permitió distinguir las partículas que contienen RNA y proteínas (ribonucleoproteínas, RNPs) de las que no presentan esta composición. Confirmó la naturaleza ribonucleoproteica del nucléolo y de otras partículas denominadas gránulos pericromatinianos (PCGs), observados por primera vez por Watson en 1962 y de los gránulos intercromatinianos (ICGs) observados por primera vez por Swift en 1958. Además, observó la naturaleza ribonucleoproteica de unos cuerpos nucleares de aproximadamente 0.5 μm de diámetro, a los que llamó cuerpos enrollados o espiralados y que más tarde recibieron el nombre de cuerpos de Cajal debido a que Ramón y Cajal los describió por primera vez en 1903, como cuerpos accesorios del nucléolo, trabajando con el microscopio de luz. Asimismo, Bernhard también observó unas partículas fibrosas, no vistas hasta entonces, a las que denominó fibras pericromatinianas (PCFs) (Figura 5) [43-48].

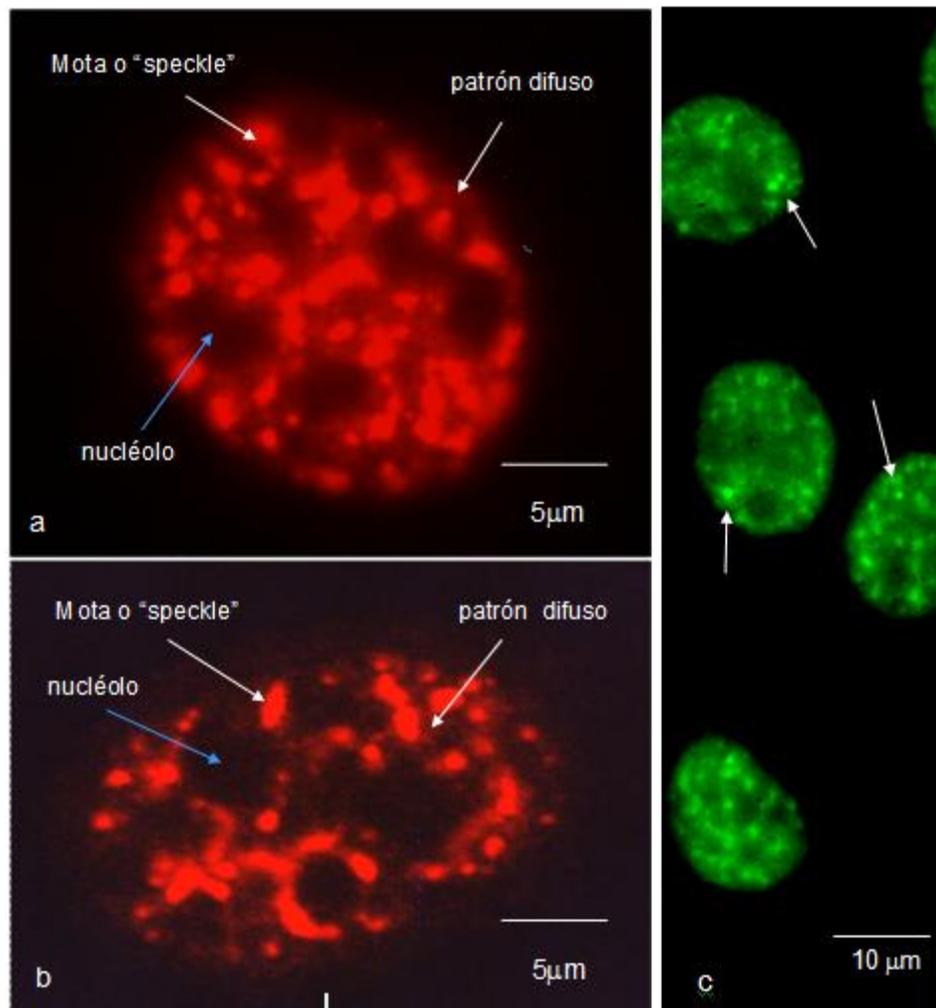


Figura 4. Patrón moteado o *speckled* en células HeLa. observado con microscopía de epifluorescencia (a, c) o microscopía confocal (b). Inmunolocalización contra factores de *splicing* no-snRNPs (factor SC35, a-b) o factores snRNPs (c). Las motas en donde se concentra la marca, están embebidas en un ambiente difuso. En c, además se tiñen los cuerpos de Cajal (flechas). El nucléolo es negativo a la tinción.

Microscopía de luz y electrónica

El uso de métodos de inmunomarcaje fluorescente y ultraestructural de proteínas con anticuerpos y de ácidos nucleicos con hibridación *in situ*, así como la utilización del microscopio confocal para el análisis de muestras fluorescentes permitió más adelante reconocer que el patrón moteado y la ultraestructura fina estaban relacionados. Así, el patrón moteado observado con el microscopio de fluorescencia y con el confocal, corresponde a los gránulos intercromatinianos (motas grandes) y a las fibras pericromatinianas (ambiente difuso de tinción) observadas con el microscopio electrónico de transmisión [39-42].

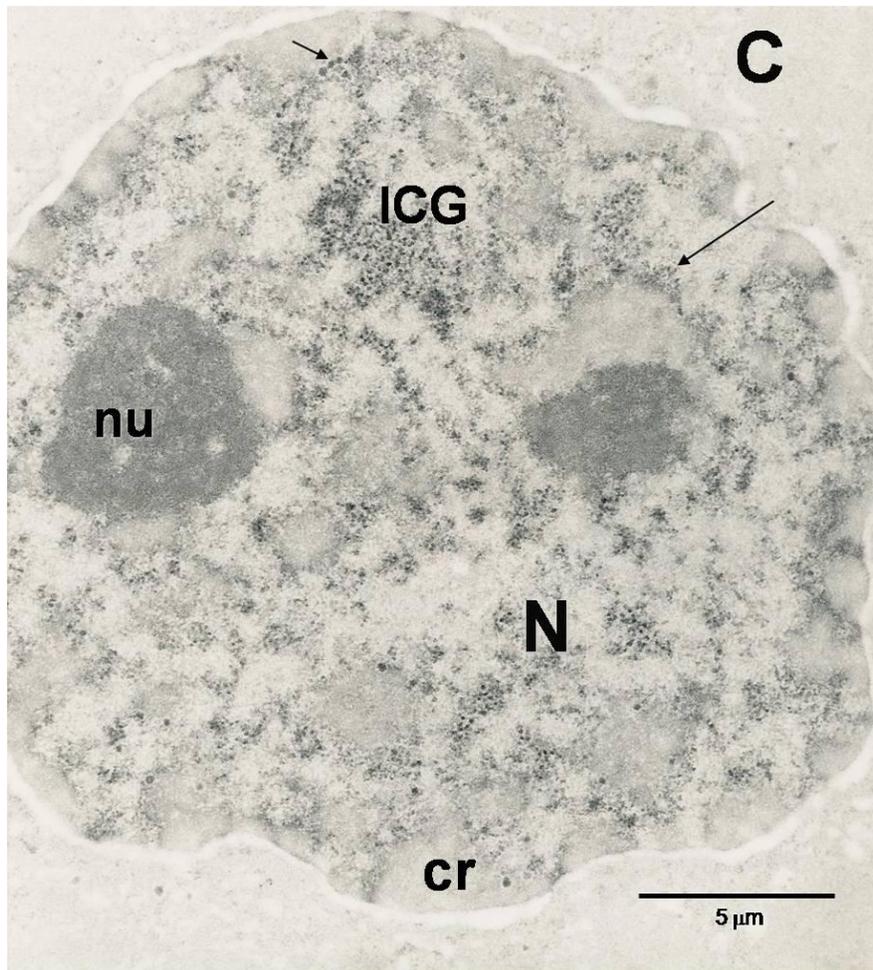


Figura 5. Ribonucleoproteínas intranucleares. Ultraestructura de un núcleo (N) interfásico contrastado con el método de Bernhard para ribonucleoproteínas. La cromatina (cr) es clara. El nucléolo (nu), los gránulos intercromatinianos (ICG), las fibras pericromatinianas (flecha grande) y los gránulos pericromatinianos (flecha pequeña) están formados por RNPs. C, citoplasma. Cortesía de los Dres. G. Vázquez-Nin y O. Echeverría, Facultad de Ciencias, UNAM.

Composición molecular de las partículas nucleares

Los gránulos intercromatinianos (ICG) son estructuras nucleares que se organizan en cúmulos en los espacios intercromatinianos del núcleo, que miden entre 20-25 nm de diámetro y juegan un papel muy importante en el ensamblado, modificación y almacenamiento de proteínas involucradas en el procesamiento del pre-mRNA. Entre los constituyentes de estos gránulos, están partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares (snRNPs), factores de *splicing* de la familia SR (como el factor SC35) y la subunidad grande de la RNA polimerasa II en su forma hiperfosforilada. Los ICGs han sido sometidos a análisis proteómicos, donde se han podido identificar 146 proteínas. Las proteínas son de diferentes tipos y entre ellas se encuentran las proteínas de la familia SR, que están involucradas en el reconocimiento del RNA y del dominio SR [34, 36, 49]. Se ha observado que si existen una acumulación de factores de *splicing* como el de las proteínas SR hiperfosforiladas en los sitios de síntesis, los ICGs se desensamblan, lo que altera la coordinación entre la transcripción y el *splicing* del pre-mRNA en núcleos de mamíferos [50].

Las fibras pericromatinianas (PCFs) fueron descritas por Monneron y Bernhard (1969) como “la expresión morfológica extranucleolar de la transcripción”. Estas estructuras tienen un diámetro de 3 a 5 nm y están situadas preferencialmente en la periferia de algunos grumos de cromatina compacta. Pueden ser observadas al microscopio electrónico de transmisión, donde son detectadas en sitios de transcripción por la incorporación de uridina tritiada o la 5-bromouridina 5' trifosfatada, lo que nos indica la presencia de transcritos nacientes [34, 40, 41, 43-48]. Se ha visto que hay una relación directa en la densidad de estas estructuras con el rango de síntesis de pre-mRNA, además de que puede ser estimulada o inhibida por la acción de varios tipos de drogas y hormonas. Aunado a esto, en estudios bioquímicos y de autorradiografía para ubicar los sitios de transcripción, se ha observado que las PCF migran hacia los espacios intercromatinianos mientras el RNA inicia la maduración.

Los cuerpos de Cajal fueron observados por primera vez por Ramón y Cajal en 1903, quien los describió como cuerpos accesorios del nucléolo. Fueron re-descritos ultraestructuralmente por Monneron y Bernhard (1969) como agregados esféricos de 0.3- 0.5 μm de diámetro, contrastados por el procedimiento de acetato de uranilo, EDTA y citrato de plomo y están formados por fibras de 40-60 nm de espesor, localizados en la zona intercromatiniana, sin relación aparente con el nucléolo. Los cuerpos de Cajal contienen moléculas que participan en la biogénesis del RNA nuclear. Hay evidencias que sugieren que tienen un papel en la modificación y ensamblaje de snRNPs. También se encuentran snoRNPs, involucradas en el procesamiento del rRNA. Sin embargo, existe la dificultad de identificar su actividad enzimática, debido a que sus componentes no son del todo específicos. En estos cuerpos se han localizado: fibrilarina (proteína específica del nucleolo), p80 coilina (específica de este cuerpo) y factores de *splicing* (U1, U2, U4, U6, y U5), así como el U3snRNA nucleolar, (precursores del U14 en plantas). Estas estructuras se disgregan durante la mitosis y se ensamblan de nuevo durante la fase G1 del ciclo celular [34, 40-44, 46, 48, 51].

Dinámica intranuclear de los factores de *splicing*

Desde que Spector [37] encontró que las motas o *speckles* contienen gran cantidad de factores de *splicing*, se pensó que tal vez ese podría ser el sitio en donde ocurre este proceso. Sin embargo, las motas o *speckles* del patrón moteado no son un sitio donde se incorpore rápidamente uridina tritiada o bromouridina, lo que indica que la transcripción no ocurre ahí. Por otro lado, en la periferia o ambiente difuso en el que se encuentran embebidas sí hay transcripción. Como la transcripción y el *splicing* están acoplados y en realidad el *splicing* es un evento cotranscripcional, se descarta que éste ocurra en las motas pero sí en la parte difusa. Más aún, para los sitios del patrón moteado al que se asocian los transcritos de pre-mRNA y de mRNA, se llevaron a cabo experimentos en los que se infectaron células HeLa con adenovirus-2. Los adenovirus infectan células de primates en un ciclo lítico que dura entre 24 y 36 horas aproximadamente. En la fase temprana (E) se producen varios transcritos, pero destaca el de la proteína E1A. Durante la fase tardía (L) se produce la **unidad de transcripción mayor tardía** (MLTU, por sus siglas en inglés). Esta unidad de transcripción puede producir hasta 14 distintos mRNAs maduros por *splicing* alternativo y de hecho, en este tipo de virus se descubrió la presencia de genes partidos y el *splicing* en 1977. Volviendo a los experimentos mencionados, conforme transcurría el tiempo de infección, los transcritos virales –y el DNA de una hebra detectados por hibridación *in situ* ocupaban varios sitios dentro del núcleo. Sin embargo, no ocupaban los territorios del patrón moteado sino que los factores de *splicing*, es decir, el patrón moteado se reorganizaba. Esto sugirió que por el contrario, los factores de *splicing* se desplazaban hacia los sitios de producción de RNA viral, generando nuevos dominios de actividad de transcripción y de *splicing*. Adicionalmente, la transfección transitoria de células COS-1 con el gen de β -tropomiosina (que normalmente no lo expresa) corroboró la reorganización de factores de *splicing* conforme transcurría el tiempo de transfección. Entonces se sugirió la hipótesis de que los factores de *splicing* debían moverse hacia los sitios de transcripción mediante un mecanismo de reclutamiento [52].

Posteriormente se encontró que la inhibición de la transcripción por drogas y del *splicing* por microinyección de oligonucleótidos contra un U1snRNA también producían un re-arreglo en el patrón moteado [53-55], así como la presencia de intrones determina también ese reclutamiento [55]. El reclutamiento de factores de *splicing* a sitios de transcripción activa dependía además de la fosforilación tanto de los factores de *splicing*, como del dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II, que mantiene un acoplamiento molecular [56-71]. Los procesos de transcripción y *splicing* del pre-mRNA están espacial y temporalmente coordinados, y la fosforilación de las proteínas regula la actividad y la localización subnuclear de los factores de *splicing* del pre-mRNA en los subcompartimientos nucleares. Se ha comprobado que la sobreexpresión de la cinasa CLK/STY provoca la redistribución de factores de *splicing* de un patrón moteado a un patrón difuso y cuando la RNA pol II es inhibida, los factores de *splicing* snRNPs y no snRNPs se redistribuyen en motas redondas, lo cual indica que los factores se almacenan. Más adelante, se transfectaron células con una construcción molecular que incluía al gen del factor de *splicing* SF2/ASF y la proteína verde fluorescente (GFP) y se registraron los movimientos mediante video. Los resultados indicaron que los factores de *splicing* se movían intensamente en el núcleo celular y su morfología y movimiento dependían de la actividad de transcripción de la célula [72-73].

De manera similar, la distribución de los factores de *splicing* durante la mitosis se podría explicar por el movimiento de éstos durante períodos de transcripción activa e inactiva. Más aún, el fenómeno de movimiento de factores de procesamiento hacia sitios de transcripción activa parece aplicarse a la maduración del pre-rRNA, pues durante la nucleogénesis en la etapa de telofase durante la mitosis, los factores de maduración del pre-rRNA en forma de cuerpos prenucleolares, se asocian con las regiones organizadoras del nucléolo (NOR) que se encuentran en actividad de transcripción intensa [74].

El patrón moteado en tejidos

Además de presentarse un patrón intranuclear moteado para los factores de *splicing* en células en cultivo, George en 2002, encontró durante sus estudios de doctorado que este patrón también se presenta en el núcleo de células que se encuentran formando parte de un tejido en varios órganos estudiados, como el hígado, el páncreas y el útero [75]. Además, la morfología celular de este patrón moteado en tejidos depende de la actividad de transcripción y del *splicing*. En efecto, en células epiteliales del útero de rata, durante la etapa de estro, cuando el estradiol circulante es muy alto y la actividad transcripcional por lo mismo es elevada, la morfología del patrón moteado presenta motas irregulares embebidas en un ambiente difuso. Por el contrario, durante la etapa de diestro, cuando el estradiol circulante está en su nivel más bajo y por ello la actividad de transcripción y *splicing* es muy baja, el patrón moteado adquiere las características de un patrón en donde las motas son muy redondas y el ambiente de tinción difusa es bajo (Figura 6). Más aún, en células epiteliales de ratas a las que se les ha eliminado los ovarios, los núcleos son similares a los que se presentan en etapa de diestro, con motas muy redondas y un ambiente difuso muy escaso. El patrón cambia rápidamente si se activan la transcripción y el *splicing* por inyección de 17β -estradiol [75], similar a lo que ocurre en células en cultivo.

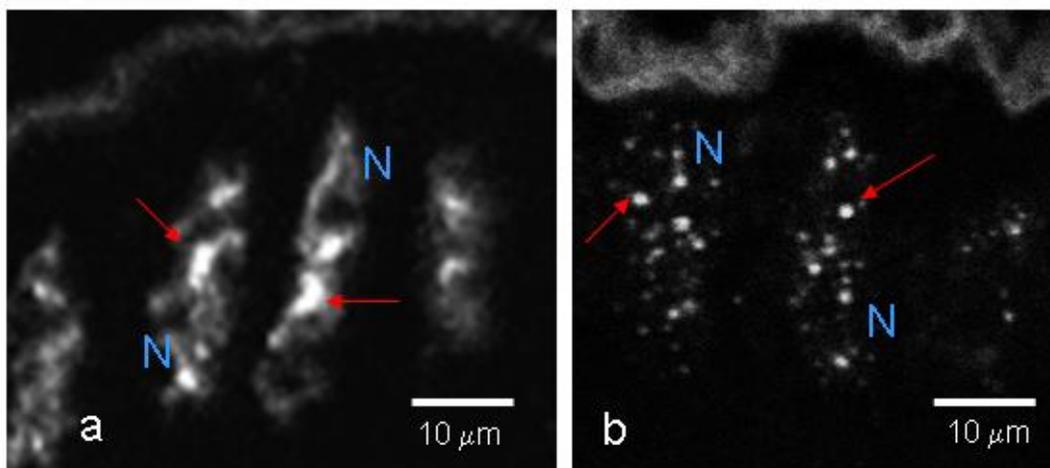


Figura 6. Organización celular de factores de *splicing* en el núcleo de células epiteliales de endometrio de rata. En los núcleos (N) de células en (a) proestro, las motas son irregulares en forma (flechas), mientras que en células en (b) diestro, son redondas.

Un modelo para la biología celular del *splicing*

Un modelo para el *splicing in situ* incluye la presencia de un patrón moteado conformado por motas irregulares con gran cantidad y actividad de movimiento de factores de *splicing* que se encuentran almacenados ahí. Los factores se mueven por fosforilación del dominio RS hacia sitios de transcripción por acoplamiento con la fosforilación del CTD de la RNA polimerasa II. En este caso, las motas son irregulares. Si se defosforilan, los factores regresan a las motas. En ausencia de transcripción y *splicing* el patrón moteado pierde la parte difusa y las motas son redondas (Figura 7).

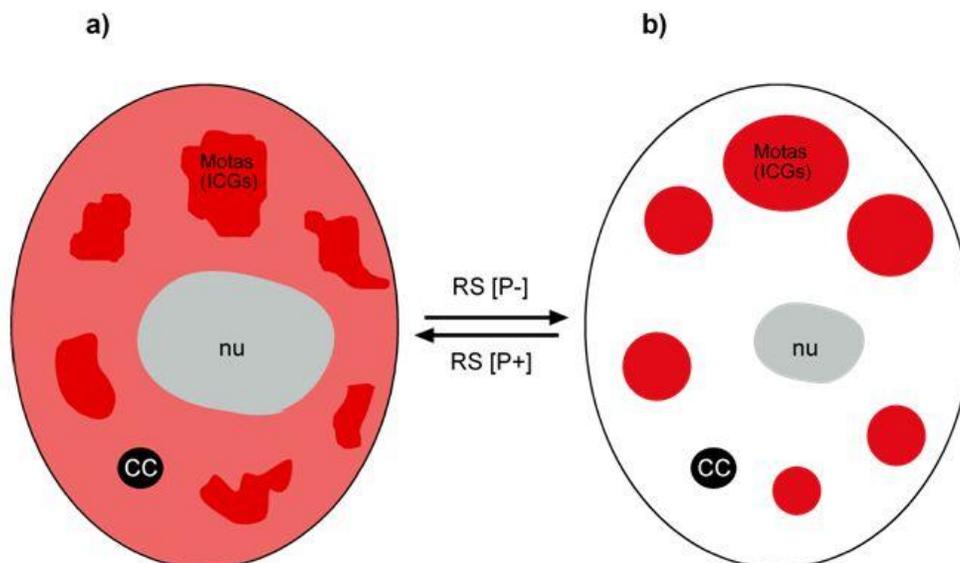


Figura 7. Modelo de la organización intranuclear de los factores de *splicing* en células con actividad transcripcional y de *splicing* activas (a) e inactivas (b). Los factores de *splicing* fosforilados producen patrón moteado (rojo brillante) y difuso (color rojo opaco), mientras que defosforilados producen un patrón moteado que pierde la parte difusa. ICGs, gránulos intercromatinianos; nu, nucléolo; CC, cuerpos de Cajal.

Referencias

1. Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R. and Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1-8.
2. Berget, S.M., Moore, C. and Sharp, P.A. (1977). Splicing segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 3171-3175.
3. Scherrer, K., Latham, H. and Darnell, J.E. (1963). Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 49, 240
4. Gilbert, W. (1978). Why genes in pieces? *Nature* 271, 501.
5. Reed, R. (2000). Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 340-345.
6. Hastings, M.L., and Krainer, A.R. (2001). Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 302-309.
7. Brow, D. A. (2002). Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet* 36, 333-60.
8. Lewin, B. (2008). *Genes IX*. Jones and Bartlett, Boston.
9. Eran, M., and T. Misteli. (2005). Splicing Misplaced. *Cell* 122, 317-318.
10. Fu, X.D. (1995). The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* 7, 663-680.
11. Fu, X.D., and Maniatis, T. (1990). Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* 343, 437-441.
12. Fu, X.D., and Maniatis, T. (1992). Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science* 256, 535-8.
13. Ge, H., and Manley, J.L. (1990). A protein factor, ASF, controls alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* 62, 25.
14. Graveley, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6(9), 1197-211.
15. Gui, J.F., Lane, W.S., and Fu, X.D. (1994). A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369, 678-682.
16. Jurica, M., and Moore, M. (2002). Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods* 28, 336-345.
17. Krainer, A.R., and Maniatis, T. (1985). Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 42, 725-736.
18. Krainer, A.R., Conway, G.C., and Kozak, D. (1990). Purification and characterization of SF2, a human pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev*, 6, 837.
19. Krämer, A., Keller, B.W., Appel, K., and Lührmann, R. (1984). The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 38, 299-307.
20. Krämer, A., and Utans, U. (1991). Three protein factors (SF1, SF3 y U2AF) function in pre-splicing complex formation in addition to snRNPs. *EMBO* 10, 1503.
21. Krämer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Ann Rev Biochem* 65, 367-409.
22. Tacke, R., Chen, Y., and Manley, J.L. (1997). Sequence-specific RNA binding by an SR proteins requires RS domain phosphorylation: Creation of and SRP40-specific splicing enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1148-1153.
23. Tacke, R., Manley, J.L. (1999). Determinants of SR protein specificity. *Curr Opin Cell Biol* 3, 358-62.
24. Trigon, S., Serizawa, H., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Jackson, S.P., and Morange, M. (1998). Characterization of the residues phosphorylated in vitro by different C-terminal domain kinases. *J Biol Chem* 273(12), 6769-75.
25. Wang, J., Xiao, S.H., and Manley, J.L. (1998). Genetic analysis of SR protein ASF/SF2: Interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes Dev* 11, 334-344.
26. Will, C.L., and Luhrmann, R. (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 3, 290-301.

27. Yeackley, J.M., Tronchere, E., Olesen, J., Dyck, J.A., Wang, H.Y., and Fu, X.D. (1999). Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol* 145, 447-455.
28. Zamore, P.D., and Green, M.R. (1989). Identification, purification and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9243.
29. Zhang, G., Taneja, K.L., Singer, R.H., and Green, M.R. (1994). Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. *Nature* 372, 809-812.
30. Zhou, Z., Lawrence, J.L., Gygi, S.P., and Robin, R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome *Nature* 419, 182-185.
31. Hall, L.L., Smith, K.P., Byron, M., and Lawrence, J.B. (2006). Molecular Anatomy of a Speckle. *The Anatomical Record Part A*, 288A, 664-675.
32. Handwerger, K.E., and Gall, J.G. (2006). Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Cell Biology* 16 (1), 19-26.
33. Huang, S., and Spector, D.L. (1992). U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles. *PNAS USA* 89, 305-308.
34. Lamond, A.I., and Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Bio* 4, 605-612.
35. Mintz, P.J., and Spector, D.L. (2000). Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. *J Struct Biol* 129, 241-251.
36. Saitoh, N., Spahr, C.S., Patterson, S.D., Bubulya, P., Neuwald, A.F., and Spector, D.L. (2004). Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Mol Biol Cell* 15, 3876-3809.
37. Spector, D.L., Schrier, H., and Busch, W.H. (1983). Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol Cell* 49, 1-10.
38. Spector, D.L. (1990). Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 147-151.
39. Spector, D.L., Fu, X.D., and Maniatis, T. (1991). Associations between distinct pre mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO* 10, 3467-3481.
40. Spector, D.L. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Ann Rev Cell Biol* 9, 265-315.
41. Spector, D.L. (2001). Nuclear domains. *J Cell Sci* 114, 2891-2893.
42. Spector, D.L. (2006). Cellular bodies. *Cell* 127, 1070.
43. Fakan, S. (1994). Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol* 4, 86-90.
44. Fakan, S., Lesser, G., and Martin, T.E. (1984) Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J Cell Biol* 98, 358-362.
45. Fakan, S., and Puvion, E. (1980). The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int Rev Cytol* 65, 255.
46. Monneron, A., and Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res* 27, 266-288.
47. Puvion, E., and Puvion-Dutilleul, F. (1996). Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp Cell Res* 229, 217-225.
48. Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., and Jiménez-García, L. El núcleo celular Interfásico. En *Biología Celular y Molecular*, Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. Prentice Hall, México. 341-394.
49. Bergman, D.B., Du, L., Van der Zee, S., and Warren, S.L. (1995). Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J Cell Biol* 129, 287-298.
50. Sacco-Bubulya, P., and Spector, D.L. (2002). Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 156, 425-436.
51. Gall, J.G. (2000) Cajal bodies: the first 100 years. *Ann Rev Cell Dev Biol* 16, 273-300.

52. Jiménez-García, L.F., and Spector, D.L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.
53. Spector, D. L., O'Keefe, RT, Jiménez-García, L.F. (1993). Dynamics of transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 799-805.
54. O'Keefe, R.T., Mayeda, C.L., Sadowski, A.R., Krainer, A.R., and Spector, D.L. (1994). Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. *J Cell Biol* 124, 249-260.
55. Huang, S., and Spector, D.L. (1996). Intron-dependent recruitment of pre-mRNA splicing factors to sites of transcription. *J Cell Biol* 131, 719-732.
56. Bentley, D., (1999). Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 347-351.
57. Cáceres, J.F., Misteli, T., Sreaton, G.R., Spector, D.L., and Krainer, A.R. (1997). Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol* 138, 225-238.
58. Cho, E.J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J., and Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev* 15(24), 3319-29.
59. Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzymes is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11, 3319-3326.
60. Cho, E.J., Rodríguez, C.R., Takagi, T., and Buratowski, S. (1998). Allosteric interactions between capping enzyme subunits and the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 15, 3482-7.
61. Dahmus, M.E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 271, 19009-19012.
62. Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14(19), 2452-60.
63. Misteli, T., and Spector, D.L. (1996). Serine/Threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors. *Mol Biol Cell* 7, 1559-1572.
64. Misteli, T., and Spector, D.L. (1997). Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trend Cell Biol* 7, 135-138.
65. Misteli, T., and Spector, D.L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell* 3, 697-705.
66. Misteli, T. (2000). Cell Biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci* 113, 1841-1849.
67. Murray, M., Kobayashi, R., and Krainer, A.R. (1999). The type 2C Ser/Thr phosphatase PP2C γ is a pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* 13, 87-97.
68. Robert, F., Blanchette, M., Maes, O., Chabot, B., and Coulombe, B. (2002). A human RNA polymerase II-containing complex associated with factors necessary for spliceosome assembly. *J Biol Chem* 277(11), 9302-6.
69. Schroeder, S.C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* 14, 2435-40.
70. Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 326-331.
71. Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416, 499-506.
72. Misteli, T., Cáceres, J.F., and Spector, D.L. (1997). The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387, 523-527.
73. Carmo-Fonseca, M., Platani, M., and Swedlow, J.R. (2002). Macromolecular mobility inside the cell nucleus. *Trends in Cell Biol* 12(11), 491-494.
74. Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M. de L., Ochs, R.L., Rothblum, L.I., Hannan, R., and Spector, D.L. (1994). Nucleogenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell* 9, 955-966.

75. George-Tellez, R., Segura-Valdez, M.L., González-Santos, L., and Jiménez-García, L.F. (2002). Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action. *Biol Cell* 94, 99-108.

Semblanza del Dr. Luis Felipe Jiménez García



El Dr. Luis Felipe Jiménez García es Profesor Titular “C” de tiempo completo en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Es biólogo, maestro y doctor en ciencias de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realizó su tesis de doctorado en el Departamento de Farmacología del Baylor College of Medicine en el Centro Médico de Texas en Houston. Posteriormente realizó una estancia posdoctoral en el laboratorio de Cold Spring Harbor, en Nueva York. Ha impartido más de 100 cursos de licenciatura y posgrado, dirigido varias tesis de licenciatura, especialidad, maestría y doctorado y ha publicado más de 40 artículos de investigación sobre temas de biología celular y molecular., en particular sobre núcleo celular y nucléolo en revistas como *Cell*, *Molecular Biology of the Cell*, *Experimental Cell Research*, *Journal of Cell Sciences*, entre otras. También ha publicado capítulos de libros como el de *Cells: a laboratory manual*, *Atomic Force Microscopy* de la serie *Methods in Molecular Biology*. Asimismo, ha coordinado la publicación del libro *Biología Celular y Molecular* y el libro de *Conocimientos Fundamentales de Biología*, Ha publicado también los libros de *Hibridación in situ ultraestructural*, *El aparato reticular endocelular de Camillo Golgi*, *Biología Celular y Molecular del Aparato de Golgi*. Obtuvo la Distinción Universidad Nacional en Docencia en Ciencias Naturales. Es investigador Nacional nivel 2 y nivel D del programa PRIDE de la UNAM. Ha sido coordinador de investigación y coordinador general del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias y fundador del actual Departamento de Biología Celular. También fue fundador del laboratorio de Nanobiología Celular de la Facultad de Ciencias. Actualmente es coordinador del programa de posgrado de la Especialidad en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas de la UNAM y presidente de la Sociedad Iberoamericana de Biología Celular. Fue también presidente de la Sociedad Mexicana de Microscopía. Su área de trabajo es la biología celular y molecular del núcleo y del nucléolo.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

SISTEMAS DE RECONOCIMIENTO CÉLULA-CÉLULA BASADOS EN S-RNASE QUE PROMUEVEN LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN LAS PLANTAS

Felipe Cruz García*, Javier Andrés Juárez-Díaz, Yuridia Cruz González-Zamora, Grethel Y. Busot-González, Andrea Hernández-Navarro.

Departamento de Bioquímica. Conjunto E. Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Ciudad Universitaria. C.P. 04510. México D.F.

*fcg@servidor.unam.mx.

Resumen

La aparición de nuevas formas alélicas en las poblaciones es un factor muy importante en la capacidad que presentan los organismos para adaptarse a nuevos ambientes.

El principal mecanismo para generar nuevos alelos es mediante la mutación. Los nuevos alelos serán distribuidos en la población mediante la recombinación y la reproducción sexual. De esta manera, la reproducción sexual juega un papel muy importante, ya que durante la meiosis ocurre la recombinación de alelos que redundará en la formación de cuatro gametos genéticamente diferentes, los cuales si llegan a ser fecundados se conjuntarán con los del otro padre, aumentando de esta manera la diversidad alélica. No obstante, si los gametos están genéticamente muy relacionados ya sea porque provienen de los hermanos o de los padres (endogamia) y si el proceso es recurrente, se alcanzará una depresión por endogamia con efectos catastróficos para las poblaciones.

Por lo general los animales evitan tener cruza con la descendencia o con los padres. Sin embargo, en las plantas parece no ser tan fácil, ya que éstas no pueden seleccionar a sus parejas de manera visual u olfativa como ocurre en animales, por lo que han desarrollado un sistema genético-bioquímico de reconocimiento y discriminación del polen (portador de gametos masculinos) que opera durante la polinización, y que es conocido como el sistema de incompatibilidad sexual (AI). Este sistema evita la autopolinización y promueve la polinización cruzada y por lo tanto la diversidad genética.

La AI se controla genéticamente por un locus multialélico, llamado el locus S. Este locus incluye dos genes fuertemente ligados. Uno de ellos codifica para la determinante masculina y es

expresado solamente en el polen y, el otro la determinante femenina que se solo se expresa en tejidos femeninos.

En las solanáceas, la determinante masculina codifica para una proteína con caja F, conocida como SLF y, la femenina para una ribonucleasa extracelular llamada S-RNasa. Para que ocurra la respuesta del rechazo del polen estas dos determinantes deben interactuar físicamente para disparar una cascada de señales que concluya con la inhibición del crecimiento del tubo polínico en cruzas incompatibles. Por lo tanto, esta revisión pretende dar un panorama general de los factores y de las redes de interacción que controlan la vía bioquímica del rechazo del polen en los sistemas de incompatibilidad gametofítico basado en S-RNasas, discutiendo los modelos más recientes del rechazo del polen.

Palabras clave: Autofecundación, incompatibilidad sexual, diversidad genética, S-RNasa, SLF.

Abstract

The ability of the organisms to get adapted to new environments mostly depends on new allelic forms, which are generated mainly by mutations. New alleles are distributed in populations through recombination and sexual reproduction. During meiosis allele recombination occurs producing four gametes with different genetic backgrounds. If gametes become fertilized, each one will develop new genetically different individuals. If gametes come from parents or progeny (endogamy), and the process is frequent, populations will have fitness problems because of endogamy depression.

To avoid endogamy problems animals usually do not cross with parents or progeny. However, this is not an easy task in plants, because they cannot select partners by smelling or viewing. Thus, plants have developed a genetic mechanism of recognition and discrimination of self-pollen, called sexual incompatibility (SI), which is controlled by the S-locus and which works during pollination encouraging the cross pollination.

SI is controlled by the S-locus, which includes two genes tightly linked. One of them encodes the male determinant, which has specific expression in pollen and the second one encodes the female determinant with expression only in the female organ. In the Solanaceae family, the male determinant encodes an F-box protein known as SLF (S-locus F-box) and the female determinant encodes an extracellular ribonuclease named S-RNase. Both proteins must interact to trigger a signal cascade that promotes pollen rejection by inhibiting pollen tube growth in incompatible crosses. This review pretends to give a general overview of known factor and their interactions that contribute to pollen rejection in S-RNase based self-incompatibility systems. Current models are discussed.

Keywords: Endogamy, sexual incompatibility, genetic diversity, S-RNase, SLF

Introducción

Para que ocurra la reproducción sexual en las plantas, es necesaria una serie de procesos que en conjunto se denominan polinización. Los eventos de la polinización inician con la liberación del polen de la antera, su transporte hacia una superficie (estigma) de una planta receptora y el establecimiento de un conjunto de interacciones polen-estigma que conducen a la germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico (TP) a través del estilo (tejido femenino de las plantas) y que culminan con la descarga de las células espermáticas al saco embrionario del ovario [1].

La polinización puede suscitarse entre distintos individuos de la misma especie (polinización cruzada) o dentro de un solo individuo cuando un pistilo (órgano reproductor femenino compuesto por el estigma, el estilo y el ovario) es polinizado por el polen de la misma flor o incluso de diferentes flores de la misma planta (autopolinización).

La mayoría de las angiospermas producen flores hermafroditas, es decir, sus flores contienen tanto a los órganos femeninos (pistilo) como a los masculinos (estambres). La cercanía de estos órganos en la flor hace suponer que la autofecundación podría ser frecuente. Sin embargo, las plantas con flores hermafroditas tienen adaptaciones morfológicas y fisiológicas que disminuyen la probabilidad de la autopolinización. Estas estrategias son la dicogamia (maduración de los órganos reproductivos en tiempos diferentes) y la hercogamia (separación espacial del pistilo y los estambres). A pesar de que estas vías evitan la autopolinización en gran medida, no resuelven el problema de la cruce con los padres, con el resto de la progenie (hermanos) o con parientes muy cercanos. Para contener con este problema, la mayoría de las especies desarrollaron un mecanismo genético-bioquímico de reconocimiento específico del polen propio, conocido como sistema de autoincompatibilidad (AI). La AI se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización [2]. Durante el rechazo específico del polen el pistilo juega un papel muy importante, ya que además de encargarse de recibir el polen en su estigma, hidratarlo y permitir su germinación, también lo guía y lo nutre durante su camino al ovario para que deposite las células espermáticas dentro del saco embrionario. El pistilo además es el responsable de reconocer y discriminar entre los granos de polen que son producidos por la misma planta de aquellos provenientes de otras plantas de la misma especie y de otras especies [3]. De esta manera, la combinación de las barreras físicas, fisiológicas y genéticas promueven la polinización cruzada, la cual junto con la recombinación meiótica y la mutación, generan la diversidad genética en las plantas. Esta diversidad se refleja en progenies vigorosas, con una mayor capacidad de adaptación a ambientes nuevos o estresantes; por el contrario, la autopolinización generalmente producirá individuos con baja adecuación.

En un ambiente natural, las plantas reciben polen de la misma planta, de individuos de la misma especie o de otras especies. Sin embargo, no todos estos granos de polen tendrán éxito en germinar o elongar sus tubos polínicos (TPs) hasta el ovario, justo por las barreras genéticas.

Además del sistema de AI que opera entre individuos de la misma especie, también existen barreras genéticas entre especies, como la incompatibilidad interespecífica, que impide la formación de cigotos híbridos entre dos especies fértiles [2].

Sistemas genéticos que controlan el rechazo del polen

Los sistemas de AI se distribuyen ampliamente en las angiospermas y se han reportado en 91 de las 271 familias descritas [4]. En muchos casos, la AI está controlada por un solo locus altamente polimórfico, conocido como el locus *S*, el cual determina la especificidad de la reacción tanto en la parte masculina (grano de polen) como en la femenina (pistilo). El número de alelos *S* presentes en una población puede ser muy grande y variar de especie a especie. Por ejemplo, en algunas especies de *Brassica* existen más de 60 alelos, en *Papaver* de 60 a 80 y en *Trifolium* de 150 a 250 [4]. La AI es un ejemplo clásico de un sistema genético que se encuentra bajo selección balanceada, la cual es una forma de selección natural que mantiene los polimorfismos genéticos dentro de una población [5, 6].

Los loci *S* generalmente son complejos e incluyen dos genes fuertemente ligados que brindan la especificidad de la incompatibilidad tanto en el polen como en el pistilo. Por esta y otras razones se utiliza el término *S*-haplotipo para referirse al complejo gen-*S* que incluye la especificidad en la parte del polen y en la del pistilo [7].

Existen dos tipos de control genético en los sistemas de AI homomórficos (los individuos en la población presentan solo morfo flora): el control gametofítico (AIG) y el control esporofítico (AIS) [8, 9]

En el sistema de AIG los componentes que determinan la incompatibilidad son expresados por el grano de polen haploide (gametofito masculino; por eso el nombre de incompatibilidad gametofítica). En este sistema de incompatibilidad, el rechazo del polen se presenta cuando el haplotipo S del polen coincide con uno de los dos haplotipos S presentes en el pistilo diploide de la planta receptora, provocando que el crecimiento del TP se inhiba en el estigma ó en el estilo.

En la figura 1A, se muestra una planta diploide S_aS_b , que producirá granos de polen S_a ó S_b . Cuando los granos de polen con el haplotipo S_a ó S_b lleguen al estigma, éstos germinarán, produciendo un TP; sin embargo, su crecimiento será inhibido a nivel del estilo. Por otro lado, si el polen tiene un haplotipo S_x , el polen será aceptado y el TP alcanzará el saco embrionario y se llevará a cabo la fecundación, produciendo una progenie con individuos S_aS_x y S_bS_x [7].

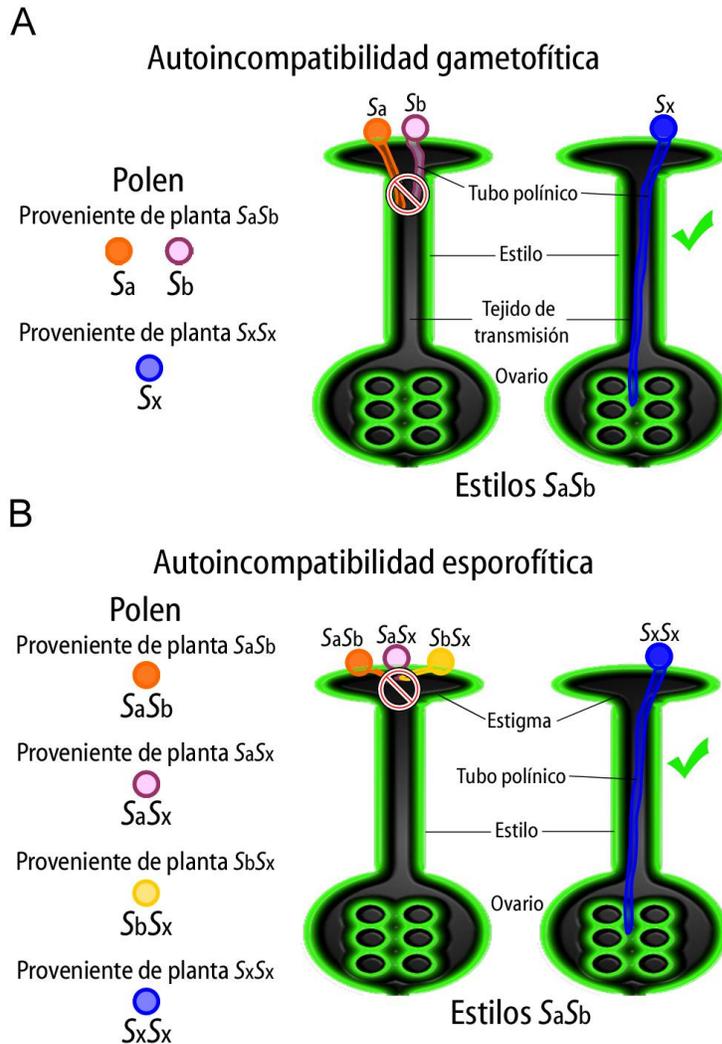


Figura 1. Sistemas de control genético del reconocimiento y rechazo del polen.

En el control gametofítico, la progenie puede intrograsar (retrocruzarse) parcialmente con los padres y con individuos de la misma progenie (Tabla 1). De esta manera, el sistema AIG restringirá poco el intercambio de alelos entre familiares.

Suponga la cruce:

$S_1S_2 \times S_3S_4$:

Progenie: S_1S_3 , S_1S_4 , S_2S_3 , S_2S_4

Tabla 1. Restricciones genéticas para introgresar con los padres y con la progenie en un sistema de incompatibilidad gametofítico.

Genotipo Pistilo	Genotipo Polen					
	S_1S_2	S_3S_4	S_1S_3	S_1S_4	S_2S_3	S_2S_4
S_1S_2	I	C	PC	PC	PC	PC
S_1S_3	PC	PC	I	PC	PC	C
S_1S_4	PC	PC	PC	I	PC	PC
S_2S_3	PC	PC	PC	PC	I	PC
S_2S_4	PC	PC	I	PC	PC	I

I= Incompatible, C= Compatible; PC= Parcialmente compatible.

El sistema AIS está determinado por los productos de los alelos S de la planta madre más que por el polen. La reacción involucra las proteínas producto de los alelos S de la planta madre. Las proteínas S son sintetizadas por tejidos diploides de la antera, como lo son el *tapetum* el pistilo. En este caso, una planta S_1S_2 producirá granos de polen con genotipos S_1 ó S_2 . No obstante, todos los granos de polen producidos por esta planta tendrán un fenotipo S_1S_2 (Figura 1B), es decir, llevarán en su superficie las proteínas S_1 y S_2 , sintetizadas en las células del tapete de la pared de la antera de la planta madre e incorporadas a la superficie del polen durante su maduración. Si los granos de polen con proteínas S_1 y S_2 caen sobre el estigma de una planta S_1S_2 , el polen será rechazado (Figura 1B). En este caso la respuesta de incompatibilidad se manifiesta como la inhibición de la germinación del polen a nivel de la superficie del estigma. No obstante, si el polen lleva los productos de los alelos S_3S_4 en su superficie (pero con un genotipo S_3 o S_4), el polen germinará y el TP crecerá hasta el óvulo, donde ocurrirá la fecundación para producir una progenie con individuos S_1S_3 , S_1S_4 , S_2S_3 y S_2S_4 . Se puede deducir que toda la progenie producirá polen con las proteínas S_1S_3 , S_1S_4 , S_2S_3 y S_2S_4 en su superficie. Como consecuencia de esto, la progenie nunca podrá introgresar con los padres S_1S_2 y S_3S_4 , ni con sus hermanos, ya que siempre habrá coincidencia con uno de los haplotipos S (Tabla 2).

Suponga la cruce:

$S_1S_2 \times S_3S_4$:

Progenie: S_1S_3 , S_1S_4 , S_2S_3 , S_2S_4

Tabla 2. Restricciones genéticas para introgresar con los padres y con la progenie en un sistema de incompatibilidad con control esporofítico.

Genotipo Pistilo	Genotipo Polen					
	S_1S_2	S_3S_4	S_1S_3	S_1S_4	S_2S_3	S_2S_4
S_1S_2	I	C	I	I	I	I
S_1S_3	I	I	I	I	I	C
S_1S_4	I	I	I	I	C	I
S_2S_3	I	I	I	C	I	I
S_2S_4	I	I	C	I	I	I

I= Incompatible, C= Compatible.

Como se observa en la Tabla 1, el sistema de AIG es hasta cierto punto menos restrictivo que el sistema de AIS, ya que este último definitivamente elimina la probabilidad de introgresión o cruce con alguna planta genéticamente relacionada.

Sistemas de autoincompatibilidad gametofíticos dependientes de S-RNasa.

El sistema de AI gametofítico es el de mayor distribución en las angiospermas. Al momento solo se han descrito a nivel bioquímico dos sistemas de AIG. Uno de ellos ocurre en la familia Papaveraceae, en el cual solo se ha identificado la determinante femenina, que es conocida como la proteína S. Por otra parte, la AIG basada en S-RNasa se ha estudiado fundamentalmente en las familias Solanaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae [8].

La S-RNasa es la determinante femenina del rechazo del polen S-específico.

En las familias Rosaceae, Scrophularaceae y Solanaceae, el producto génico del locus S en el pistilo es una proteína con actividad de ribonucleasa, conocida como S-RNasa [10, 11]. Las S-RNasas son glicoproteínas de aproximadamente 30 kDa que se expresan en el estigma, en el estilo y en el ovario. Las S-RNasas son secretadas hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, sitio por el cual el TP crece hacia al ovario [10, 12-16].

Experimentos de ganancia o pérdida de función con plantas transgénicas en *Solanum*, *Petunia* y *Nicotiana* demuestran que la expresión de diferentes transgenes de *S-RNasas*, causa cambios en el fenotipo de polinización, pasando de compatible a incompatible o viceversa. Por ejemplo, la transformación de los híbridos de *Nicotiana langsdorffii* X *N. alata* $S_{105}S_{105}$ que expresan los transgenes de la S_{A2} -RNasa ó la S_{C10} -RNasa, genera plantas transgénicas capaces de rechazar el polen S_{A2} ó S_{C10} , un fenotipo que las plantas sin transformar no presentan. Por otra parte, en *Petunia inflata* el experimento consistió en transformar plantas de *P. inflata* S_1S_2 con el transgen S_3 -RNasa en sentido o con el transgen de S_2 -RNasa en antisentido. Los resultados obtenidos indican que las plantas que expresan a la S_3 -RNasa rechazan el polen S_3 , mientras que aquellas que expresaron en antisentido el transgen S_2 aceptan el polen S_2 [17-19] De esta manera, los resultados anteriores son una fuerte evidencia de que la S-RNasa es la determinante femenina en el rechazo del polen S-específico.

Se propone que las S-RNasas actúan como agentes citotóxicos S-específicos [10, 20] Esta hipótesis se basa en el hecho de que cuando se presenta la reacción de AI, el RNA del TP de *N. alata* es degradado, sobre todo el rRNA [21]. Un dato importante que apoya este modelo fue brindado por Huang *et al.* (1994) [22], quienes por mutagénesis dirigida reemplazaron una de las dos histidinas conservadas en el sitio activo de la S_3 -RNasa de *P. inflata*. El resultado fue que el pistilo de las plantas transgénicas resultantes fueron incapaces de rechazar el polen S_3 debido a la incapacidad de la S_3 -RNasa para degradar el RNA del TP. Otra evidencia importante es la mutante natural autocompatible (AC) de *Lycopersicon peruvianum* (las plantas silvestres son AI), la cual expresa una S-RNasa inactiva porque uno de los residuos de histidina del sitio activo fue sustituido por una arginina [23, 24].

Las S-RNasas entran a los TP, probablemente por endocitosis, no importando si los TP son compatibles o incompatibles [25, 26]. Si la crucea es compatible, las S-RNasas permanecen encerradas en una vacuola, pero si es incompatible, éstas se liberan al citoplasma, donde ejercen su efecto citotóxico [26] (Figura 3). Este modelo de compartimentalización se discute en mayor detalle más adelante.

SLF es la determinante masculina en el rechazo del polen S-específico.

El producto del alelo S del polen se identificó primero en *P. inflata* [27] Este gen se conoce como *SLF* (*S-locus F-box protein*) y su producto es miembro de una familia de proteínas que contienen una caja F. Las proteínas con caja F están principalmente involucradas en la degradación de proteínas vía el proteosoma 26S [28] La expresión de *SLF* es haplotipo-específica y está restringida al polen [27]. Los experimentos que llevaron a la comprobación de que *SLF* es la determinante masculina se basaron en los hallazgos de Golz *et al.* (2001) [29]. Estos investigadores propusieron el modelo de la interacción competitiva para explicar por qué las mutantes que tienen duplicado el alelo S del polen en *N. alata*, son incapaces de rechazar el polen con el mismo haplotipo de una de las S-RNasas de un pistilo diploide. La interacción competitiva ocurre en plantas autocompatibles mutantes que codifican y expresan en el polen dos alelos S diferentes. La duplicación de alelos pasa en plantas irradiadas con rayos γ en las que se duplica solamente la región del locus S que codifica el alelo S del polen ó en aquellas plantas tetraploides donde se encuentra duplicado todo el locus. Entre los granos de polen producidos por estas plantas mutantes, los que portan y expresan dos diferentes alelos S en el polen (polen heteroalélico) son aceptados por un pistilo donde coincida su haplotipo, pero no así en los granos de polen que llevan dos copias idénticas del mismo alelo S (polen homoalélico) [29]. De acuerdo con lo anterior, el razonamiento que Sijacic *et al.* (2004) [27] siguieron para determinar que *SLF* es la determinante masculina, fue transformar plantas incompatibles de *P. inflata* S_1S_1 , S_1S_2 , ó S_2S_3 , con el transgen SLF_2 fusionado a un promotor específico de polen. Por lo tanto, las plantas transgénicas resultarían producirían polen homoalélico ($SLF_2 + S_2$) ó heteroalélico ($SLF_2 + S_1$ ó $SLF_2 + S_3$). Los resultados mostraron que sólo el polen heteroalélico fue aceptado por interacción competitiva, pero no aquél proveniente de las plantas que

produjeron polen homoalélico. De esta manera, estos datos demuestran fehacientemente que *SLF* es la determinante masculina en los sistemas de incompatibilidad basados en *S-RNasa*. Otros datos que confirman que *SLF* es la determinante masculina son los reportados por Lai *et al.* (2002) [30] y Qiao *et al.* (2004) [31] en *Antirrhinum hispanicum*. En esta especie, el gen *AhSLF₂* se clonó y expresó en el polen de plantas AI del homócigo de *P. hybrida* *S₃S₃*. Las plantas transgénicas que expresaron a *AhSLF₂* y produjeron polen heteroalélico *S₃AhSLF₂*, fueron incapaces de rechazar el polen *S₂*. De esta manera, se concluye que el gen *AhSLF₂* está implicado en la AI [31].

El gen *SLF* codifica una proteína con una caja F, la cual pertenece a la familia de las enzimas tipo ligasas E3 [27]. La degradación de proteínas vía el proteosoma 26S involucra el marcaje por poliubiquitilación de las proteínas que se van a degradar. En este proceso, las enzimas E3 ligasas representan un paso crucial en el control de la poliubiquitilación de la proteína blanco, ya que E3 reconoce la señal de ubiquitilación en la proteína seleccionada y coordina la transferencia de la ubiquitina (proteína de 8.6 kDa) desde la E2 ligasa a un residuo de lisina de la proteína blanco [28]. El reconocimiento de la proteína blanco y la transferencia de ubiquitina por las ligasas E3, puede ocurrir por la formación de un complejo protéico conocido como SCF-E3, el cual se forma por cuatro proteínas: SKP1, Culina, una proteína con caja F y RBX1 [32, 33].

Factores estilares no ligados al locus S involucrados en el rechazo del polen

Aunque la *S-RNasas* y *SLF* son las determinantes de especificidad de la incompatibilidad, existe evidencia genética que indica que los productos de genes modificadores (GM), no ligados al locus S, son importantes en la vía bioquímica del rechazo del polen S-específico [19, 34-38].

Los GM se clasifican en tres grupos [39]. El grupo I incluye genes cuyos productos regulan la expresión de las determinantes de la especificidad (*SLF* y *S-RNasa*) en la respuesta de incompatibilidad. Un ejemplo de este grupo de genes lo describieron Tsukamoto *et al.* [38, 40] (1999; 2003) en una población silvestre de *Petunia axillaries*, con plantas autocompatibles (AC) y autoincompatibles (AI). Estos autores encontraron que la expresión de la *S₁₃-RNasa* está suprimida en las plantas AC por una mutación en el locus *MDF*.

El grupo II comprende GM que regulan la actividad biológica de las determinantes de especificidad. Por lo tanto, su función se restringe a la respuesta de incompatibilidad. De este grupo, sólo dos GM están identificados y su papel directo en la respuesta del rechazo del polen ha sido comprobada [41, 42]. Estos GM codifican para las proteínas HT-B y 120K. HT-B es una proteína de 8.2 kDa rica en asparagina, mientras que 120K es una arabinogalactoproteína de 120 kDa. Ambas proteínas ingresan al TP en *N. alata* [26]. Su papel en la AI fue confirmado silenciando los genes que codifican estas proteínas por técnicas de RNA en antisentido y RNA de interferencia en plantas transgénicas de *Nicotiana*. Cuando estos genes se silenciaron de manera independiente, se observó que las plantas transgénicas pasaron de ser AI a AC. El crecimiento de los TP en los estilos de estas plantas no se afectó, lo que confirmó la participación exclusiva de *HT-B* y *120K* en la AI. Otros grupos de investigación han confirmado el papel de *HT-B* como un GM en *Lycopersicon* y *Solanum* [43-45], aunque su función bioquímica exacta aún es desconocida.

La proteína 120K es una proteína específica de estilos de *N. alata* que forma complejos *in vitro* con las *S-RNasas* [46]. La proteína 120K ingresa a los TP no importando si son compatibles o incompatibles [42, 26] (. Además, en cruza compatibles y en etapas tempranas de la polinización de cruza incompatibles, 120K se encuentra delimitando el interior de las vacuolas donde se encuentran secuestradas las *S-RNasas* en el TP. Sin embargo, en etapas tardías (36 h) de una polinización incompatible, 120K ya no se detecta en los TP [26] (. Estas

evidencias sugieren que 120K está asociada a los sistemas membranosos en el TP y que su participación en el rechazo del polen podría ser durante la liberación de las S-RNAsas de dicho compartimiento mediante su asociación con algún factor del polen, el cual funcionaría en coordinación con HT-B. Otro dato importante acerca de 120K, es que no está involucrada en el transporte de las S-RNAsas desde la MEC del TT del estilo al citoplasma del TP, ya que en plantas transgénicas donde 120K fue silenciada, su transporte no se afectó [42]. Datos adicionales que hacen suponer la asociación de HT-B y 120K con sistemas membranosos es que 120K y HT-B se encuentran en una fracción microsomal de los TPs AI, los cuales son recuperados de estilos densamente polinizados. Experimentos de solubilidad, utilizando la fracción microsomal, indican que si esta fracción es tratada con NaCl sólo se solubilizan la S-RNasa y 120K, pero si después de este tratamiento se utiliza un detergente, se puede recuperar a HT-B en el sobrenadante (B. McClure, comunicación personal). Estos resultados preliminares sugieren que HT-B podría estar anclada a la membrana de la vacuola que secuestra a las S-RNAsas en el TP. Esta hipótesis es reforzada por el hecho de que HT-B incluye en su extremo carboxilo secuencias consenso (CaaX, CXC y CC) a las que podrían unírseles grupos isoprenoides, como residuos de geranil o farnesil, los cuales poseen un carácter hidrofóbico que colaborarían en el anclaje de las proteínas solubles a las membranas celulares [47].

El tercer grupo de GM incluye genes que funcionan en el rechazo del polen y en otros procesos de la interacción polen-pistilo. Algunos candidatos potenciales incluyen proteínas tales como la proteína NaTTS (proteína específica del TT del estilo de *N. alata*), NaPELPIII (proteína similar a extensina) y Nap11 (una proteína de 11 kDa, similar a una quimiocianina). Estas proteínas interactúan físicamente con las S-RNAsas [39, 48-50]. Otro factor que es un buen candidato para ser un GM del grupo III es *NaTrxh*. Este gen codifica una tiorredoxina h que se secreta a la matriz extracelular del TT de estilos de *N. alata* y que reduce a las S-RNAsas *in vitro* [51].

Modelos para el rechazo del polen en el sistema de AI gametofítica

Modelo de la degradación de las S-RNAsas.

Debido a la relación de SLF con las E3 ligasas Qiao *et al.* [53] (2004) propusieron un modelo que involucra la degradación de la S-RNasa como el mecanismo del rechazo del polen. En este modelo se propone que la compatibilidad se debe a la ubiquitilación de la S-RNasa de un haplotipo diferente al del polen y su consecuente degradación mediada por el proteosoma 26S. Por ejemplo, en un estilo heterocigoto S_1S_2 polinizado con polen S_1 , tanto la S_1 -RNasa como la S_2 -RNasa ingresarán al TP, y siguiendo este modelo, la S_2 -RNasa será ubiquitilada y degradada vía el proteosoma 26S: por otro lado, la S_1 -RNasa permanecerá activa ya que de alguna manera no del todo clara al momento, evadirá la degradación y ejercerá su actividad citotóxica (Figura 2). Este modelo predice entonces que SLF y la S-RNasa deben formar un complejo SCF, el cual es un tipo de complejo E3 ligasa de ubiquitina. De esta manera, el complejo SCF estaría compuesto de proteínas tales como SKP1, culina1 y Rbx1 [52].

Bajo la premisa anterior, Qiao *et al.* (2004) [53] desarrollaron experimentos bioquímicos y genéticos de interacción proteína-proteína para determinar la existencia de los complejos en los TP de *Antirrhinum hispanicum*. Los resultados muestran que AhSLF interactúa *in vitro* con proteínas que participan en la selección de los blancos para la degradación por el proteosoma 26S. Estos interactores son: SKP1, proteínas similares a la culina1 y las mismas S-RNAsas, aunque la interacción de SLF con las S-RNAsas es haplotipo inespecífica. Ensayos de inmunoprecipitación indican que de existir un complejo SCF en *A. hispanicum*, éste es atípico porque SLF inmunoprecipita con una proteína de 23 kDa que es ortóloga de ASK1 de *A. thaliana* y con una proteína inusualmente pequeña de 65 kDa, que reacciona con un anticuerpo anti-culina1 de *Arabidopsis* [53].

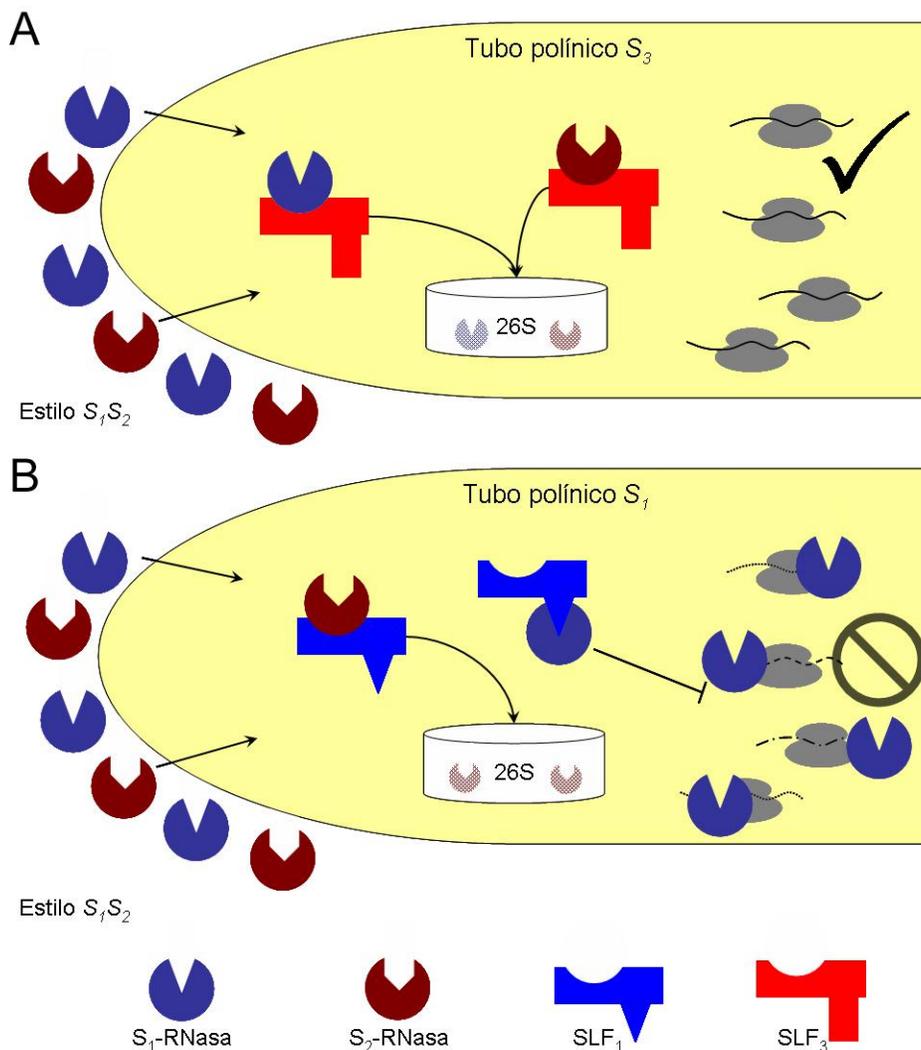


Figura 2. Modelo de la degradación de la S-RNasa por el proteosoma 26S. En el panel A se aprecia una cruz compatible entre un TP S₃ creciendo en un estilo S₁S₂. En este caso tanto la S₁-RNasa como la S₂-RNasa se unen inespecíficamente a SLF, lo que provoca su ubiquitilación y degradación por el proteosoma 26S. Panel B. Cruz incompatible entre un TP S₁ creciendo en un estilo S₁S₂. En este caso se forman complejos S-RNasa-SLF específicos e inespecíficos. Solo los últimos serán degradados por el proteosoma 26S. Por lo que el complejo S-RNasas específico estará activo para degradar al RNA del TP ocasionando su muerte eventualmente.

Siguiendo esta idea Huang *et al.* (2006) [54] realizaron experimentos que sustentaran la existencia del complejo SCF donde SLF sería un componente importante. Mediante ensayos de doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando a AhSLF₂ como proteína anzuelo, se recuperó a la proteína AhSSK1 (AhSLF *interacting SKP1-like1*). Posteriormente, en experimentos *in vitro* de interacción proteína-proteína, utilizando a AhSSK1 como anzuelo, se observó que ésta se une a otras cinco proteínas diferentes, una de las cuales es la culina1 con una masa molecular de 85 kDa, lo que es más cercano a la reportada. Para evaluar su función en el crecimiento de TPs, se generó una dominante negativa de AhSSK1 y se expresó de manera transitoria en TP creciendo *in vitro*. Sin embargo, no se observó ningún cambio en su crecimiento, lo que sugiere que AhSSK1 y cualquier complejo en donde ésta pudiera participar, no es indispensable para el crecimiento del TP *in vitro*.

Resultados recientes encaminados a apoyar el modelo de la degradación de las S-RNAsas por el proteosoma 26S, indican que SLF en *Petunia hybrida* puede formar un complejo SCF no canónico compuesto por la proteína SBP (proteína de unión a S-RNasa que incluye un dominio RING-HC), con la S-RNasa, con una culina1 G y con la enzima E2 ligasa que conjuga ubiquitina [55]. Los autores proponen que este complejo denominado SBP1 podría suplir el papel de SKP1 y Rbx1. Sin embargo, a pesar de lo prometedor de los resultados, todavía queda pendiente evaluar si el complejo existe *in vivo* y si todas las proteínas que se mencionan forman parte del complejo SCF no canónico. Datos adicionales indican que SBP1 interacciona preferentemente con las S-RNAsas del mismo haplotipo que SLF y que la S-RNasa tiene la potencialidad de ubiquitilarse y ser degradada por el proteosoma 26S de manera S-inespecífica [55]. (A pesar de que los resultados que apoyan estas aseveraciones se desarrollaron *in vitro* y utilizando un extracto libre de células provenientes de TP creciendo *in vitro* y la adición externa de inhibidores del proteosoma 26S (e.g. MG132), estos son relevantes para el modelo de la degradación de las S-RNAsas vía el proteosoma 26S. Sin embargo, el modelo propuesto por Qiao *et al.* (2004) [53] y Hua y Kao (2006) [55], hace dos omisiones fundamentales: 1) no explica por qué existen grandes cantidades de S-RNasa que permanecen en los TP que no van a ser rechazados, si justamente su hipótesis se basa en la degradación de la S-RNasa vía el proteosoma 26S y; 2) no involucra a los genes modificadores *HT-B* ni *120K*.

Modelo para la compartimentalización de las S-RNAsas.

Este modelo se apoya en resultados recientes que indican que las S-RNAsas son transportadas por endocitosis al citoplasma de los TP independientemente de su haplotipo, cuando éstos crecen por el tejido de transmisión de un estilo diploide. Una vez en el interior del TP, las S-RNAsas pueden permanecer o no en una vacuola, dependiendo de si la cruz es compatible o incompatible [26]. Además, este modelo incluye la participación de los productos de los genes modificadores estilares *HT-B* y *120K*.

En los TPs de cruza compatibles, la proteína HT-B es degradada y la S-RNasa permanece secuestrada en la vacuola, la cual está delimitada en su interior por la proteína 120K. Este mismo fenómeno se observa en plantas transgénicas que no expresan a HT-B. Sin embargo, en una cruz incompatible, HT-B permanece estable, 120K ya no se detecta y la membrana vacuolar que contiene a las S-RNAsas parece desintegrarse, observándose ahora a las S-RNAsas dispersas y en grandes cantidades a lo largo del citoplasma del TP. Estos resultados son congruentes con la gran cantidad de S-RNasa observada tanto en TPs compatibles como incompatibles.

De esta manera, el modelo de la compartimentalización (Figura 3) de las S-RNAsas en vacuolas, propone la situación de una cruz con granos de polen compatibles e incompatibles [polen S_3 (compatible) o S_1 (incompatible) en un pistilo S_1S_2]. Además, incluye a los factores estilares como la S-RNasa, las proteínas 120K y HT-B, como componentes de un sistema selectivo del rechazo del polen secretado a la MEC del estilo [26].

En este modelo se propone que el polen S_1 evita ser rechazado porque las S-RNAsas permanecen secuestradas en la vacuola como consecuencia de la degradación de HT-B. Por ejemplo, en un heterócigo, ambas S-RNAsas entrarán de manera inespecífica a los TP y estarán compartimentalizadas en la vacuola. Sin embargo, para que ocurra el rechazo del polen S-específico las determinantes de especificidad deben interactuar físicamente en el citoplasma del TP, ya que SLF es citoplasmática. Aquí se presenta una paradoja, ya que en las primeras horas de la polinización las S-RNAsas están almacenadas en la vacuola. Una posible solución a este problema es que exista una "fuga" de las S-RNAsas al citoplasma, la cual podría ocurrir durante el proceso de tráfico vesicular desde los endosomas tempranos a su destino vacuolar final.

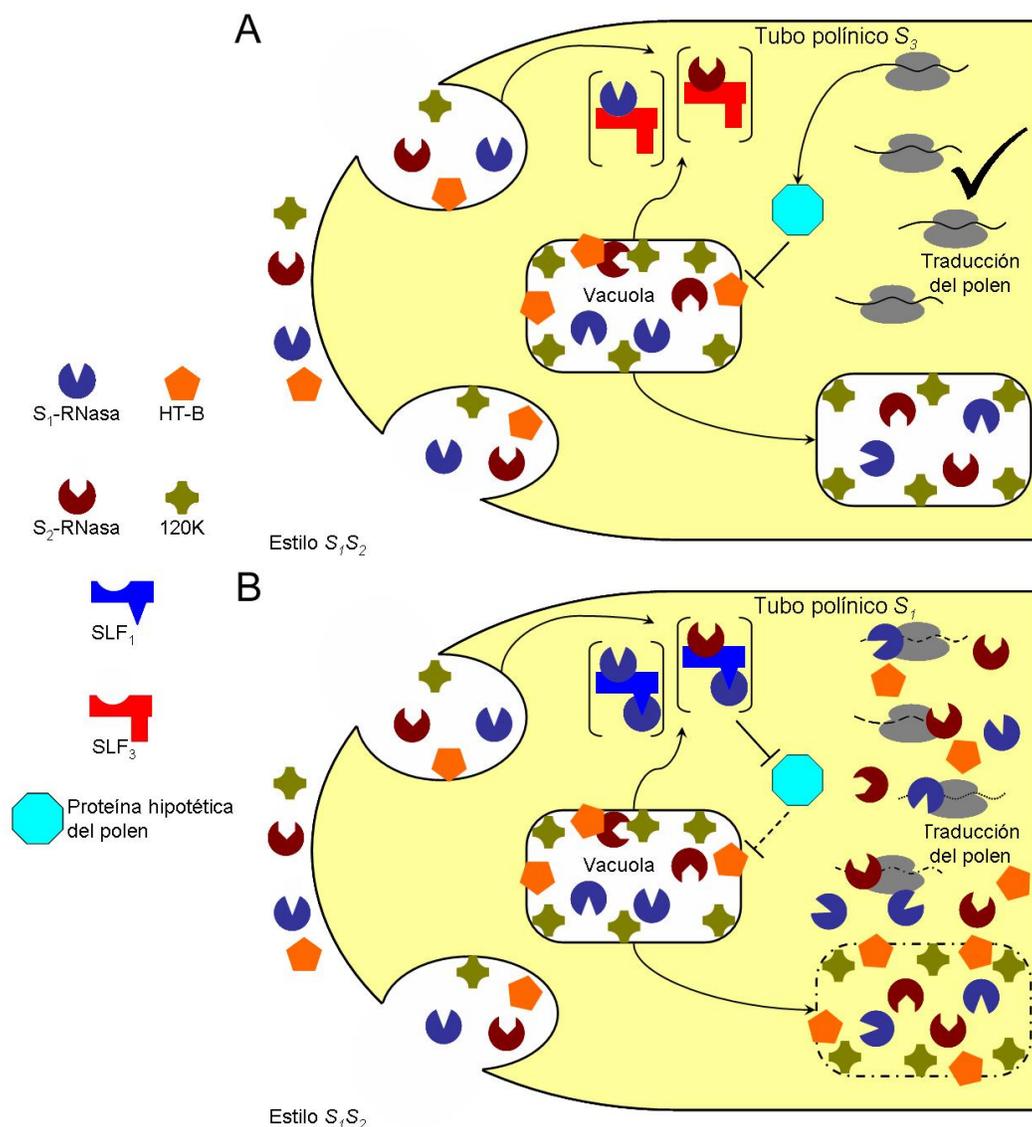


Figura 3. Modelo de la compartimentalización de las S-RNasas.. En el panel A se aprecia una cruz compatible entre un TP S_3 creciendo en un estilo S_1S_2 . En este caso tanto la S_1 -RNasa como la S_2 -RNasa se introducen al TP por endocitosis junto con las proteínas HT-B y 120K. En este modelo el polen S_1 evita ser rechazado porque las S-RNasas permanecen secuestradas en la vacuola como consecuencia de la degradación de HT-B. Sin embargo, si la cruz es incompatible (Panel B), esto es, un TP S_1 creciendo en un estilo S_1S_2 , la vacuola que almacena a las S-RNasas se degrada y las S-RNasas se liberan al citoplasma degradando el RNA del TP y provocando su muerte. Todo este proceso desde luego será desencadenado por la interacción S-específica entre la S-RNasa y SLF.

Para explicar la presencia de las S-RNasas en el citoplasma, McClure (2006) [56] propone que éstas podrían seguir la ruta que usa la toxina ricina para su localización en el citoplasma donde lleva a cabo su acción. La ricina es una toxina que se produce en los cotiledones de *Ricinus*. Para evitar la autotoxicidad, las células productoras secuestran a la toxina en una vacuola, cuando las plántulas de *Ricinus* son atacadas por herbívoros, las células blanco de éstos incorporan a la toxina por endocitosis para iniciar un transporte vesicular retrógrado y así alcanzar el retículo endoplasmático, donde la mayoría de la toxina es marcada

por glicosilación para su degradación en el proteosoma 26S. Sin embargo, una pequeña cantidad escapa a la degradación y es liberada al citoplasma donde interferirá con la maquinaria de síntesis de proteínas para matar a la célula. Si las S-RNasas siguieran una vía similar, se podría explicar la presencia de las S-RNasas en el citoplasma del TP, ya que siguiendo este camino las dos S-RNasas (la S₁-RNasa y la S₂-RNasa) provenientes un pistilo heterócigo, tendrían la misma probabilidad de estar en el citoplasma de un TP S₃, para interactuar con SLF₃ (compatible) o con SLF₁ (incompatible) si el TP fuera S₁.

En un TP S₁, creciendo en un pistilo S₁S₂, la interacción SLF₁-S₁-RNasa es dominante sobre la interacción SLF₁-S₂-RNasa. El modelo predice que la interacción SLF₁-S₁-RNasa estabiliza a HT-B previniendo su degradación. El mecanismo mediante el cual esto ocurre es desconocido y el efecto podría ser indirecto. HT-B podría ser degradada por una proteína hipotética del polen. Esta proteína sería degradada como consecuencia de la interacción SLF₁-S₁-RNasa (incompatible).

En resumen, en una cruce incompatible, la poca S₁-RNasa presente en el citoplasma se une a SLF₁ y se inicia la degradación del RNA, alterando la homeostasis del TP. Esto provoca que HT-B no se degrade y que las vesículas que contienen a las S-RNasa se disuelvan, liberándolas en el citoplasma y reforzando la respuesta de incompatibilidad. Por el contrario, en una cruce compatible donde la interacción de los determinantes es SLF₁-S₂-RNasa, HT-B se degradaría sin causar daño severo al RNA, permitiendo que el mecanismo de homeostasis del polen puede repararlos y continuar con el crecimiento de los TP hacia el ovario.

Conclusiones

A pesar de las discrepancias que aparentemente pudieran presentarse entre ambos modelos del rechazo del polen en los sistemas de incompatibilidad basados en S-RNasa, podría existir un punto donde estos converjan. Este sería en el de la interacción entre la S-RNasa y SLF, ya que ambos modelos reconocen que esta interacción es indispensable para que ocurra la respuesta de rechazo del polen de manera alelo S-específica. Sin embargo, es claro que otros genes del polen no ligados al locus S, también participan en la incompatibilidad. En un reporte reciente se refuerza la idea anterior porque se demuestra que en *Prunus* (Rosaceae, sistema de AIG basado en S-RNasa) se requieren genes modificadores del polen para que ocurra el rechazo del polen, ya que una mutante del polen que no tiene duplicado el locus S, ni presenta mutaciones que provocan la pérdida de actividad de SLF, produce polen que no es reconocido como incompatible [57].

Para explicar de una forma integral la vía bioquímica del rechazo del polen en los sistemas basados en S-RNasa, se considera que es indispensable identificar los genes modificadores del polen (GMP) que seguramente interactúan con los factores estilares diferentes a las S-RNasas. Por lo tanto, creemos que la identificación de los GMP contribuirá en gran medida a responder las siguientes preguntas:

1. ¿Son los factores estilares o los polínicos los responsables de la incorporación de las S-RNasas, HT-B y 120K al citoplasma del TP?
2. ¿Cómo se asocian a los sistemas membranosos del TP las S-RNasas, HT-B y 120K?
3. ¿Cómo se estabiliza HT-B en el citoplasma de un TP incompatible?
4. ¿Cuál es el papel de 120K en el citoplasma de un TP incompatible?
5. ¿Cómo se establecen las interacciones S-RNasa-SLF en el citoplasma de los TPs?

Referencias

1. Franklin-Tong VE (2002). *Current Opinion in Plant Biol.* 5:14-18.
2. de Nettancourt D. (2001). Berlin: Springer-Verlag. Germany
3. Swanson R., A. F. Edlund., y D. Preuss. (2004). *Annu. Rev. Genet.* 38:793-818.
4. Dickinson HG, Crabbé MJC, Gaude T (1992). *Int. Rev. Cytol.* 140:525-561.
5. Charlesworth D, Vekemans X, Castric V, Glemin S: (2005). *New Phytol.* 168:61-69.
6. Newbigin E, Uyenoyama MK: (2005). *Trends Genet.* 21:500-505.
7. Cruz-García F. y McClure BA (2001). Sexual incompatibility. En: S.S. Bhojwani y W.Y. Soh (Editores). *Current Trends in the embryology of Angiosperms.* pp167-196. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
8. Newbigin E, Anderson MA, Clarke AE (1993). *Plant Cell* 5: 1315-1324.
9. Sims TL (1993). *Critical Reviews in Plant Science.* 12:129-167.
10. McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE (1989). *Nature* 342:955-957.
11. Kao TH, McCubbin AG (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12059-12065.
12. Anderson MA, Cornish EC, Mau S-L, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Boning I, Grego B, Simpson R, Roche PJ, Haley JD, Penschow JD, Nial HD, Tregear GW, Coghlan JP, Crawford RJ, Clarke AE (1986). *Nature* 321:38-44.
13. Cornish EC, Pettitt JM, Bonig I, Clarke AE (1987). *Nature* 326:99-102.
14. Broothaerts W, Janssens GA, Proost P, Broekaert WF (1995). *Plant Mol. Biol.* 27:499-511.
15. Sassa H, Nishio T, Kowyama Y, Hirano H, Koba T, Ikehashi H (1996). *Mol. Gen. Genet.* 250:547-557.
16. Xue Y, Carpenter R, Dickinson HG and Coen ES (1996). *Plant Cell* 8:805-814.
17. Lee HS, Huang S, Kao TH (1994) *Nature* 367:560-563.
18. Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA (1994). *Nature* 367: 563-566.
19. Murfett JM, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure BA (1996). *Plant Cell* 8:943-958.
20. Gray JE, McClure BA, Bonig I, Anderson MA, Clarke AE (1991). *Plant Cell* 3:271-283.
21. McClure BA, Gray JE, Anderson MA, Clarke AE (1990). *Nature* 347, 757-760.
22. Huang S, Lee H-S, Karunanandaa B, Kao T-h (1994). *Plant Cell* 6:1021-1028.
23. Kowyama Y, Kunz C, Lewis I, Newbigin E, Clarke AE, Anderson MA (1994). *Theor. Appl. Genet.* 88:859-864.
24. Royo J, Kunz C, Kowyama Y, Anderson M, Clarke AE, Newbigin E (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6511-6514.
25. Luu DT, Oin X, Morse D, Cappadocia M (2000). *Nature* 407:649-651.
26. Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-García F, McClure B (2006). *Nature*, 439:805-810.
27. Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao TH (2004). *Nature* 429:302-305.
28. Sullivan JA, Shirasu K, Deng XW (2003). *Nat. Rev. Genet.* 4:948-958.
29. Golz JF, Oh H, Su V, Kusaba M, Newbigin E (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:15372-15376.
30. Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y (2002). *Plant Mol Biol.* 50:29-42.
31. Qiao H, Wang F, Zhao L, Zhou J, Lai Z, Zhang Y, Robbins TP, Xue Y. (2004). *Plant Cell* 16:2307-2322.
32. Cardozo T, Pagano M (2004). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:739-751.
33. Smalle J y Vierstra RD (2004). *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:555-590.
34. Anderson E y de Winton D (1931) *Ann. Mo. Bot. Grad.* 18:97-116.
35. Mather K (1943). *J. Genetics.* 45:215-235.
36. Martin FW (1968). *Genetics* 60:101-109.
37. Ai Y, Kron E, Kao TH (1991). *Mol. Gen. Genet.* 230:353-358.
38. Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Masada M, Zhu X, Marchesi E, Kao T-h (1999) *Sex Plant Reprod.*;12:6-13.
39. McClure BA, Cruz-García F, Beecher BS, Sulaman W (2000). *Annals of Bot* 85:113-123.
40. Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubun H, Marchesi E, Kao TH (2003). *Plant Physiol.* 131:1903-1912.
41. McClure BA, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R (1999). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96:13548-13553.
42. Hancock N, Kent L, McClure BA (2005). *Plant J.* 43:716-723.
43. O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y, Matton DP (2002). *Plant J.* 32:985-996.
44. Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T, Kowyama Y (2002).

- Plant J. 29:627-636.
45. Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T, Kowyama Y (2002). *Plant J.* 30:143-153.
 46. Cruz-García F, Hancock CN, Kim D, McClure B (2005). *Plant J.* 42:295-304.
 47. Galichet A. y Gruissem W. (2003). *Current Opinion in Plant Biol.* 6:530-535.
 48. Cruz-García F, Hancock CN, McClure B (2003). *J. Exp. Bot.* 54:123-130.
 49. Cruz-García F, Hancock CN, Kim D, McClure B (2005). *Plant J.* 42:295-304.
 50. Cruz-González Zamora, Y. (2006). Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. UNAM. México.
 51. Juárez-Díaz JA, McClure B, Vázquez-Santana S, Guevara-García A, León-Mejía P, Márquez-Guzmán J, Cruz-García F (2006). *J. Biol. Chem.* 281:3418-3424.
 52. Willems AR, Schwab M, Tyers M (2004). *Biochim. Biophys. Acta.* 1695:133-170.
 53. Qiao H, Wang H, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y, Xue Y (2004b). *Plant Cell* 16:582-595.
 54. Huang J, Zhao L, Yang Q, Xue Y (2006). *Plant J.* 46:780-793.
 55. Hua Z y Kao T-H (2006). *Plant Cell* 18: 2531-53
 56. McClure B (2006). *Current opinion in Plant Biology.* 9: 639-646.
 57. Vilanova S, Badenes ML, Burgos L, Martínez-Calvo J, Llácer G, and Romero C (2006). *Plant Physiol.* 142: 629-641.

Semblanza del Dr. Felipe Cruz García



El Dr. Felipe Cruz García es Biólogo, Maestro en Ciencias y Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad Nacional Autónoma de México; realizó una estancia Posdoctoral y estancias de Investigación en la Universidad de Missouri-Columbia, USA. Actualmente se desempeña como Profesor Titular A de Tiempo Completo en el departamento de Bioquímica de la facultad de Química de la UNAM. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores como Investigador Nacional Nivel I y es Nivel C del PRIDE dentro de la UNAM. Ha dirigido 6 tesis de Licenciatura, 3 de Maestría y 1 de Doctorado, y tiene 9 más en proceso. Sus líneas de investigación se centran en el control molecular de la determinación del sexo y la genética molecular de la reproducción sexual en plantas. Su producción científica incluye 12 artículos en revistas internacionales y 2 en nacionales; dos capítulos en libros (1 nacional y 1 internacional) y participación en dos más.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

CÁNCER DE GLÁNDULA MAMARIA Y METÁSTASIS: UN CRECIENTE PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA EN MÉXICO

Alejandro Zentella Dehesa ^{1,2}, Susana Frías ^{1,2}, Gabriela Galicia Vázquez ^{1,2}, Edgar Josué Ruiz Medina², Emilio Córdova Alarcón ⁴, José Luís Ventura Gallegos ², Julio R Ramírez Velázquez ³, Noé Castro Sánchez ³, Delina G Montes Sánchez ^{1,2} y María de Jesús Ibarra Sánchez ¹

¹ Departamento de Bioquímica,

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

² Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

³ Departamento de Hematología y Oncología,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán."

⁴ Instituto Nacional de Ciencias Genómicas.

Resumen

El cáncer de glándula mamaria es la manifestación oncológica más frecuente en mujeres en todo el mundo. En México esta forma de cáncer presenta tasas de muerte que van en aumento sin que se sepa con certeza la razón de este incremento. La mortalidad está ligada a los estadios más avanzados de la enfermedad donde se presenta diseminación del cáncer a órganos como el pulmón, hígado y hueso. Los estudios básicos y clínicos han evidenciado una serie de oncogenes que participan en su desarrollo como el receptor Her-2/Neu o las ciclinas D1, D3 y E, así como los genes supresores p53, ATM, PTEN, BRCA1 y BRCA2. Junto con la expresión de receptores a hormonas esteroideas como el receptor de estrógenos y de progesterona, estos genes se emplean ya rutinariamente en el diagnóstico del cáncer de glándula mamaria y son de utilidad en el pronóstico de la evolución de la enfermedad. Los tratamientos de quimio, radioterapia y los procedimientos quirúrgicos aplicados a las etapas tempranas de la enfermedad son muy exitosos para curar a estas pacientes. Sin embargo, el panorama es menos favorable cuando se aplica a pacientes con formas que presentan invasividad y metástasis. Actualmente, las pacientes que presentan metástasis se consideran incurables. El tener un mayor conocimiento sobre las bases moleculares y celulares que

determinan la capacidad de diseminación de las células de cáncer de glándula mamaria así como de su selectividad por su órganos blanco puede ayudar a interferir con estas formas de la enfermedad.

Palabras clave: invasividad tumoral, metástasis, microarreglos, tamoxifen, terapias blanco.

Abstract

Breast cancer is the most frequent oncologic manifestation in women throughout the world. The death rate due to this type of cancer is increasing without any known explanation. Mortality is linked to the more advanced stages of the disease where dissemination occurs to organs such as lung, bone marrow or liver. Basic and clinical studies have uncovered a series of oncogenes that participate in the progression of the disease such as the receptor HER-2/Neu or the cyclins D1, D3 and E, as well as the tumor suppressor genes p53, ATM, PTEN, BRCA1 and BRCA2. Together with the expression of steroid hormone receptors to estrogens and progesterone these genes are normally used in the diagnosis of breast cancer as well as in the prognosis of the progression of the disease. When applied to the early stages of the disease, chemo- and radio-therapies together with surgical procedures are very effective in curing patients. However, when used in patients with invasive or metastatic forms of the disease the outlook is less promissory. Today, metastatic forms of breast cancer are considered incurable. Having a better understanding of the molecular and cellular bases of the dissemination of breast cancer cells as well as of the bases for the organ selectivity may contribute to interfere with these stages of the disease.

Keywords: tumoral invasiveness, metastasis, microarrays, tamoxifen, target based therapies

Introducción

El cáncer es una de las tres primeras causas de muerte en la población mundial (Informe 2002 de la Organización Mundial de la Salud, (WHO); [1]. En nuestro país la muerte de pacientes oncológico se encuentra después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. En algunos países el cáncer de glándula mamaria es la primera causa de muerte entre mujeres en edad reproductiva [2] y en México ocupa el segundo lugar, aunque en algunos estados del norte de la República ya se encuentra en primer lugar. Más aún, la tasa de mortalidad es mayor a la de cualquier otra enfermedad oncológica en las mujeres incluso que la de cáncer cérvicouterino (INEGI 2004) [3]. A partir de estos datos se estima que diariamente mueren entre 8 y 11 mujeres mexicanas a causa de cáncer de glándula mamaria y esta cifra va en aumento.

Afortunadamente, cuando el cáncer se detecta en sus etapas iniciales, los esquemas terapéuticos existentes son muy eficientes; por desgracia, esto no es así para las etapas invasivas y el pronóstico es malo para las pacientes con metástasis. Por tanto, la adquisición de un fenotipo invasivo, que permite la diseminación de células cancerosas, representa hoy en día una de las principales causas de morbimortalidad en las pacientes con cáncer de glándula mamaria y para los pacientes oncológicos en general. En países desarrollados donde la detección temprana de enfermedades como el cáncer cervicouterino o el cáncer de glándula mamaria es muy eficaz la tasa de mortalidad es mucho menor a la incidencia en la población. Sin embargo, en países como el nuestro, la falta de programas adecuados de detección temprana se refleja en una elevada tasa de mortalidad asociada a formas avanzadas de la enfermedad.

Oncogenes y genes supresores de tumor

Los estudios realizados durante la segunda mitad del siglo pasado con virus que inducen tumores en animales definieron al cáncer como una enfermedad causada por genes alterados, lo que permitió la identificación de los oncogenes celulares y los genes supresores de tumores [4-8]. Este avance ha permitido comprender algunos mecanismos por los cuales una célula normal se vuelve cancerosa y se multiplica en forma descontrolada. El estudio de estos genes alterados mostró que el cáncer, es en realidad una variedad de diferentes enfermedades con características fenotípicas y comportamientos similares como la proliferación descontrolada, la resistencia a la apoptosis y la posibilidad de invadir tejidos vecinos y diseminarse a órganos distantes de su tejido de origen [9].

El análisis retrospectivos de los genes mutados a lo largo de la progresión del cáncer de colon en biopsias de pacientes llevó a la conclusión de que las mutaciones se acumulan en forma secuencial a lo largo de varias décadas de vida, iniciándose como un tumor benigno asociado a la aparición de dos o tres mutaciones en oncogenes o genes supresores de tumor [8].

Oncogenes

Los oncogenes son versiones alteradas de genes normales conocidos como protooncogenes, cuyas funciones son importantes para el control de la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación celular. Los mecanismos por los cuales se transforman en oncogenes son la amplificación génica, rearrreglos génicos, mutaciones puntuales y en algunos casos la participación de agentes virales. Por ejemplo, el receptor Her2, pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En el cáncer de glándula mamaria este gen suele amplificarse generando varias copias del gen y por ende hay una sobreexpresión de este receptor. El resultado es una ganancia de función que no sólo favorece una proliferación descontrolada, sino que además activa mecanismos de protección contra la muerte celular por apoptosis. Mientras que Her-2 sólo se presenta en el 20-25% de las pacientes con cáncer de glándula mamaria en el 50% de todos los diferentes tipos de cáncer humano, se presenta el oncogén ras se genera por mutación del protooncogén ras. Por tanto los protooncogenes son genes que codifican para elementos que normalmente activan las vías de señalización mitogénica. Algunas mutaciones generan productos génicos permanentemente activos, estas versiones mutantes de los protooncogenes se denomina oncogenes, siendo ras y myc los más frecuentes en la mayoría de los tumores humanos. Ras pertenece a la familia de proteínas G pequeñas (GTPasas que intercambian GDP por GTP). Cuando están unidas a GTP conduce una señal proliferativa evocada por factores solubles como las del factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs). Las mutaciones oncogénicas de ras interfieren con su actividad de GTPasa y por lo tanto, en las células tumorales se prolonga su estado activo y la señalización mitogénica [3, 5, 6].

Genes supresores de tumores

Por otro lado, los genes supresores de tumor promueven la formación de un tumor cuando existe una pérdida o inactivación de éstos o de sus productos proteicos [4,6-9]. Las mutaciones puntuales o deleciones más extensas promueven la inactivación de estos genes en los diferentes tumores humanos. El representante más frecuente de este grupo de genes es p53, una nucleoproteína cuyo estado de fosforilación oscila entre G1 y S y entre M y G1. P53 es un factor de transcripción tetramérico que activa la expresión de un gran número de genes involucrados en múltiples procesos como arresto en el ciclo celular, senescencia, apoptosis, angiogénesis y reparación del DNA. Uno de los genes que se activan por p53 es el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21. En respuesta a daño en el DNA celular se expresa p53 y

en consecuencia p21 con lo que se interrumpe temporalmente el avance del ciclo celular. Por tanto, las células que contienen mutaciones en p53 y que inactivan su función, no pueden detener la progresión del ciclo celular ni la replicación del DNA cuando está dañado. El resultado es que el material genético se replica con alteraciones cromosómicas, aumentando así la tasa de acumulación de mutaciones [3-6]. Paralelamente, las mutaciones con pérdida de función transcripcional de p53 previene la activación de la muerte celular por apoptosis que se da cuando p53 promueve la expresión de proteínas proapoptóticas como puma.

Los estudios sobre la progresión del cáncer de colon mostraron que las mutaciones tempranas no ocurren necesariamente en oncogenes, ya que el gen responsable de la formación de polipos adenomatosos del colon (APC: adenomatous polyposis coli) es un gen supresor de tumores. La gran mayoría de los genes mutados en las primeras etapas de esta progresión tumoral corresponden a elementos de señalización de vías que controlan la proliferación celular.

Mientras que ras no se encuentra mutado con frecuencia en el cáncer de glándula mamaria, las mutaciones de p53 si son muy frecuentes y se asocian con un mal pronóstico. Por lo anterior, la detección de mutaciones en p53 suele formar parte de los estudios histopatológicos que se realizan en biopsias de cáncer de glándula mamaria.

Es importante resaltar que aunque las células tumorales pueden estar mutadas en distintos oncogenes y genes supresores de tumores las células presentan un fenotipo muy semejante al que se denomina estado transformado. El primero en emplear este término fue Peyton Rous quién en 1904 inició los estudios celulares de la transformación oncogénica asociada a la infección aviar con el virus del sarcoma de Rous. Estos estudios llevaron a David Bishop para la identificación del primer oncogen, la cinasa de residuos de tirosina v-src, que en cáncer humano no se presenta. Todas las células transformadas presentan comportamientos aberrantes como el ser inmortales, presentar una proliferación descontrolada independiente de factores externos, viabilidad y proliferación independiente de su adhesión a un sustrato, la inhibición de la muerte celular por apoptosis, la capacidad de promover su vascularización y de invadir los tejidos vecinos así como la capacidad de diseminarse y desarrollar focos de crecimiento secundario o metástasis [5, 6, 8]. Como ya se mencionó, esta última fase de la progresión tumoral es la principal causa de muerte relacionada a todas las formas de cáncer [9].

¿Cuántos genes son necesarios para generar un fenotipo transformado? Bastó con la sobreexpresión de tres genes en células epiteliales de glándula mamaria para inducir un fenotipo inmortal y con características transformadas. Los genes introducidos fueron: 1) la subunidad catalítica de la telomerasa, que permite mantener la longitud de los telómeros al final de cada replicación; 2) el antígeno T del virus de simios SV40 que interfiere con las funciones de las proteínas de retinoblastoma (Rb) y p53, dos frenos del ciclo celular y 3) la oncoproteína H-ras que activa la cascada mitogénica de las MAP cinasas. La sobreexpresión de estos tres genes condujo a la amplificación del protooncogen c-myc. Es interesante que a pesar de que ninguno de los tres oncogenes introducidos corresponde a los oncogenes que normalmente se asocian al desarrollo de tumores de la glándula mamaria igual se generó el fenotipo tumoral con un bajo grado de diferenciación, capaz de infiltrarse y de formar tumores en el tejido mamario al ser inyectadas en ratones atímicos [10].

Estadificación, pronóstico y tratamiento

El cáncer de glándula mamaria se estratifica en cinco estadios: 0) corresponde a pacientes con un crecimiento canceroso in situ; I) generalmente involucra un tumor en etapas tempranas de vascularización menor a 2 cm de diámetro, ausente de los ganglios y sin metástasis; II) son pacientes con un tumor vascularizado, con un diámetro mayor de 2 cm y menor a 5 cm, que está presente en ganglios, pero que aún no presenta metástasis; III) pacientes con un tumor con un diámetro mayor a 5 cm y que ya se encuentra presente en

nódulos supraclaviculares y IV) pacientes que ya presentan focos de crecimiento metastásico. La mayoría de las pacientes en México llegan a los servicios de oncología entre los estadios II y IV. Su pronóstico es mejor si los estudios histopatológicos son negativos para los receptores de estrógenos y de progesteronas así como a la amplificación del receptor Her2. Es igualmente bueno si las biopsias son negativas para mutaciones en los genes supresores de tumores p53, BRCA1 y BRCA2.

En contraposición a la eficacia curativa de la quimioterapia, la radioterapia y los procedimientos quirúrgicos cuando el cáncer se detecta en etapas tempranas el pronóstico es malo y puede conducir a la muerte cuando se detecta en etapas invasivas o metastásicas. Si bien hay un extenso conocimiento sobre los genes que dan origen al cáncer y sobre las funciones que se encuentran alteradas, aún no existe ninguna terapia molecular curativa. Este tipo de terapias orientadas, en su gran mayoría, a interferir en forma selectiva con la función incrementada que se asocia con un oncogén en particular se denominan "terapias blanco". Esta falta de efectos curativos de las terapias blanco reflejan muy probablemente la naturaleza genética multifactorial de las enfermedades oncológicas. Una de estas terapias blanco con resultados alentadores es el uso de anticuerpos monoclonales humanizados contra el receptor Her2 que se sobreexpresan en el 20-25 % de las formas invasivas de cáncer de glándula mamaria. Este anticuerpo, cuyo nombre comercial es trastuzumab o herceptina al unirse al receptor Her2 promueve la muerte por apoptosis de las células de cáncer de glándula mamaria. Sin embargo, sus efectos citotóxicos no son suficientes para que pueda ser usado como una monodroga, por tanto, el trastuzumab se emplea, con muy buenos resultados, en combinación con inhibidores de la función de los microtúbulos como el taxol o la vincristina o con agentes que dañan al DNA como la adriamicina para debilitar al tumor antes de una cirugía. Con todo, las terapias blanco siempre revelan un panorama más complejo cuando se evalúan sus efectos secundarios. Así, por ejemplo, el trastuzumab produce alteraciones cardíacas, en particular una disfunción sistólica, y además, puede inducir un broncoespasmo pulmonar semejante al de asma, sin que hasta la fecha se comprendan las bases moleculares de estos dos efectos colaterales adversos.

Por otro lado, los tratamientos de quimio y radioterapia más eficaces siguen siendo hasta hoy relativamente inespecíficos al estar dirigidos a envenenar a todas las células con una alta tasa de división celular. Ya que las células tumorales se dividen más rápidamente que las células de los diversos epitelios las células tumorales mueren, pero las células epiteliales también se envenenan, pero gracias a que se dividen más lentamente que las células tumorales no llegan a morir. Esto explica los múltiples efectos colaterales como la caída del cabello o la inflamación y disfunción de los epitelios de la cavidad oral y del tracto gastrointestinal conocida como mucocitis. El potencial curativo de la quimio y la radioterapia sigue justificando sus efectos nocivos colaterales. Por tanto, las aproximaciones inespecíficas siguen siendo, en la mayoría de los tratamientos, la forma más efectiva de atacar el avance del cáncer. Estos fármacos incluyen antimetabolitos como la 5'-fluorouridina, agentes que producen daño oxidativo o alquilación del DNA como el cisplatino o la adriamicina y fármacos que interfieren con los microtúbulos como el taxol o la vincristina. Como ya hemos mencionado, en el cáncer de glándula mamaria la adriamicina, también conocida como doxorubicina constituye la primera línea de tratamiento, seguida del taxol y la vincristina. Cabe mencionar que para el cáncer de glándula mamaria la radioterapia no forma parte de los tratamientos convencionales.

Es claro que el desarrollo y la aplicación de procedimientos y pruebas diagnósticas que permitan la identificación temprana son las mejores aproximaciones para reducir la mortalidad del cáncer de glándula mamaria y del resto de las enfermedades oncológicas. Sin embargo, en el presente y en el futuro inmediato, los servicios oncológicos de nuestro país seguirán atendiendo pacientes con estadios avanzados de la enfermedad que en muchos casos presentan metástasis o la desarrollan dentro de los siguientes 5 años de haber sido sometidas a esquemas combinados de quimioterapia seguidos de cirugía. Por este motivo, diversos grupos

de investigación incluyendo al nuestro siguen estudiando las bases moleculares y celulares de la invasión y de la metástasis.

Progresión tumoral

De todas las características del fenotipo transformado, una tasa elevada de proliferación es la primera en presentarse y es la más común de todas ellas. Es interesante notar que la mayoría de los tumores sólidos se derivan de células epiteliales, que por su propia naturaleza presentan altos índices de división celular. Este es el caso del cáncer de pulmón, la enfermedad oncológica más prevalente y de mayor mortalidad en el mundo, del cáncer de piel (melanomas) o del cáncer de colon o de riñón. También se derivan de epitelios secretores, como el cáncer de próstata, el cáncer de ovario o el cáncer de glándula mamaria, en este último la gran mayoría de los tumores se derivan de células del epitelio ductal y en menor grado del epitelio lobulillar, siendo este último el responsable de secretar la mayoría de las proteínas y demás componentes de la leche. Otros tumores se derivan de epitelios endocrinos como el cáncer de páncreas o el de tiroides. La elevada frecuencia con la que los tumores se originan de células epiteliales se asocia a su potencial proliferativo. Sin embargo, las células tumorales también se originan de otros tejidos como los sarcomas que se derivan de células del mesénquima o los linfomas, derivados de las células progenitoras de los diversos linajes hematopoyéticos.

A pesar de tener un origen tisular diverso, de provenir de epitelios o de células del mesénquima, de presentar diferentes combinaciones de oncogenes y de genes supresores de tumores, la transformación celular y la progresión que va de un crecimiento contenido (benigno) hacia un crecimiento invasivo y metastático (maligno) se encuentran sorprendentemente conservadas entre los diferentes tipos de cáncer y presentan fenotipos y comportamientos muy semejante.

La figura 1 muestra en forma esquemática la progresión del cáncer de glándula mamaria que va de un crecimiento neoplásico benigno a un crecimiento metastático en órganos distantes como pulmón hígado y hueso [8]. El tumor se manifiesta inicialmente como un foco de proliferación anormal o neoplasia (nuevo crecimiento). Cuando se pierde la organización natural de las células en el tejido de origen se identifican diferentes grados de displasia (crecimiento desordenado), todas estas etapas son tratables y tienen un buen pronóstico curativo por lo que se consideran "benignas". En una segunda etapa, las células cancerosas adquieren la capacidad de destruir las láminas basales que delimitan el espacio de su tejido de origen y se consideran invasivas. La masa tumoral puede aumentar en volumen hasta 1 cm^3 sin necesidad de estar vascularizada, nutriéndose por difusión del líquido intersticial. Es importante considerar que la detección de una masa de un 1 cm^3 o menor no es fácil y no suele identificarse en muchos tumores originados en tejidos internos pero es posible en la glándula mamaria con una exploración cuidadosa y frecuente. Sin embargo, a partir de este volumen, muchas de las células tumorales sufren hipoxia, misma que induce la producción de factores que promueven el crecimiento de nuevos vasos, principalmente VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) y bFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos). Estos factores y otros cambios en el entorno de la masa tumoral favorecen la vascularización del tumor permitiendo su crecimiento más allá de 1 cm^3 . A partir de esta etapa se considera que el tumor es "maligno" por su capacidad invasiva local. La tercera etapa se caracteriza por la diseminación de las células tumorales por vía hematógica o linfática, proceso denominado metástasis. Este proceso se inicia cuando las células ingresan a la circulación sanguínea o linfática (intravasación) pudiendo así alcanzar cualquier parte del cuerpo. Al circular por los vasos que irrigan a sus órganos blanco las células metastásicas interactúan con el endotelio, se adhieren firmemente y atraviesan la monocapa endotelial por un proceso denominado extravasación. Una vez en el espacio intersticial de sus órganos blanco ocurre la invasión y se establece un foco de crecimiento secundario en el órgano blanco. La adhesión, la extravasación y el establecimiento parecen depender de una interacción funcional entre el órgano blanco y las células metastásicas. Se ha

estimado que sólo una de cada millón de las células metastásicas que ingresan al torrente sanguíneo logra establecer un foco metastásico exitoso [5, 9]. Por ello, la gran mayoría de los pacientes que presentan formas metastásicas tienen mal pronóstico.

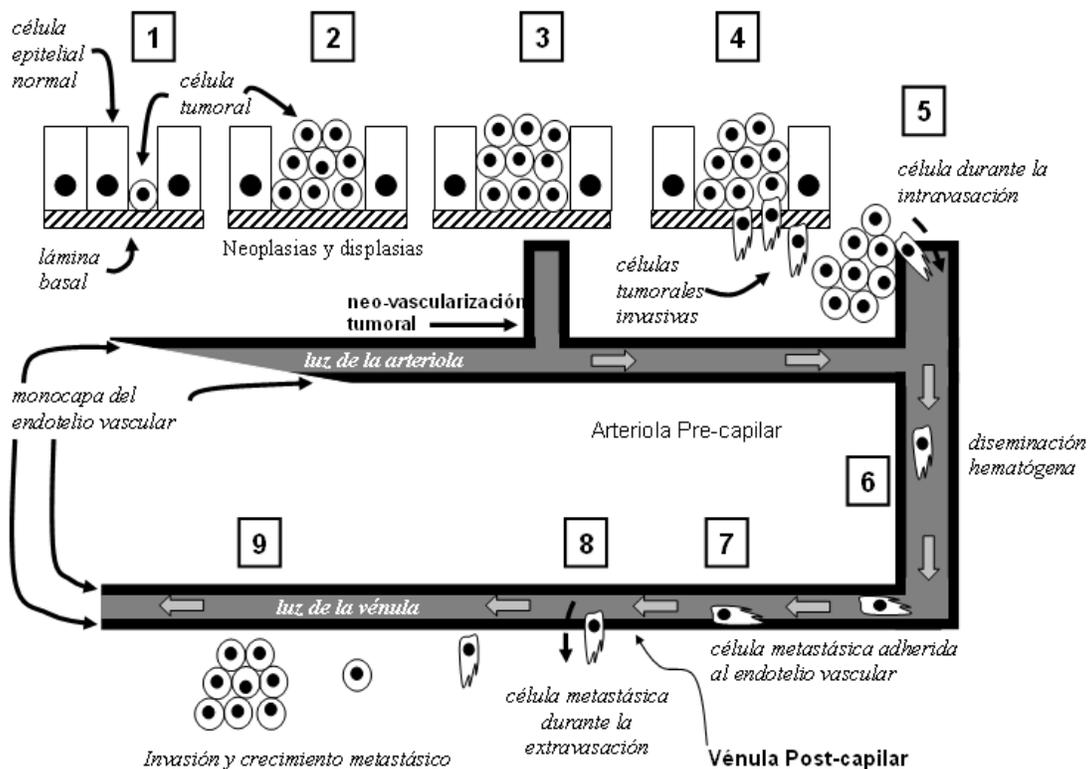


Figura 1 Etapas en la progresión tumoral. 1: aparición de una célula tumoral dentro de un epitelio; 2: crecimiento neoplásico benigno, contenido dentro de su lámina basal; 3: adquisición de capacidad invasiva *in situ* al romper la lámina basal; 4: vascularización del tumor; 5: intravasación, las células tumorales entran al torrente sanguíneo o a la circulación linfática; 6: diseminación por los lechos vasculares o linfáticos; 7: adhesión de las células metastásicas al endotelio vascular de órganos blancos distantes; 8: extravasación de la célula metastásica e ingreso al tejido blanco; 9: crecimiento secundario de las células metastásicas.

Es importante resaltar que las células cancerosas no presentan comportamientos que no estén codificados en el genoma, simplemente los presentan fuera de tiempo y del lugar para el que están fisiológicamente programados. Una gran interrogante que aún queda por ser resuelta es como un grupo relativamente pequeño de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores permite la expresión anormal de programas genéticos invasivos y metastáticos, reminiscentes de estadios embrionarios. Así, por ejemplo, la elevada tasa de proliferación de las células tumorales es semejante a la acelerada división celular durante las primeras etapas del desarrollo embrionario o a la expansión clonal de las células B que producen anticuerpos. La capacidad de invadir tejidos distintos al tejido de origen es similar al comportamiento de las células del ectotrofoblasto durante la implantación de la mórula, o a la forma en que se infiltran los neutrófilos y los polimorfonucleares durante una reacción inflamatoria [5]. Otro ejemplo de migración e invasión ocurre cuando las células que forman parte del epitelio de la cresta neural migran para formar las estructuras derivadas de los arcos branquiales. Este fenómeno es semejante a lo que ocurre en melanomas invasivos y metastáticos [13]. Los procesos de vascularización tumoral recapitulan lo que ocurre cuando los órganos y tejidos después de un

infarto y no pueden nutrirse más por difusión del líquido intersticial. Al entrar en hipoxia, estos tejidos favorecen la formación de nuevos vasos (angiogénesis).

En el caso del cáncer de glándula mamaria, la diseminación sigue inicialmente el flujo natural de la circulación linfática llevando a las células cancerosas a los ganglios linfáticos axilares (Fig. 2). La alta frecuencia de metástasis pulmonar también se explica en parte por ser este órgano el primero al que llegan las células metastásicas. Sin embargo, la invasión a pulmón requiere de una interacción de codependencia entre las células metastásicas y el mesénquima pulmonar. Las células de cáncer de glándula mamaria también pueden invadir hueso cortical, médula ósea o hígado (Fig. 2).

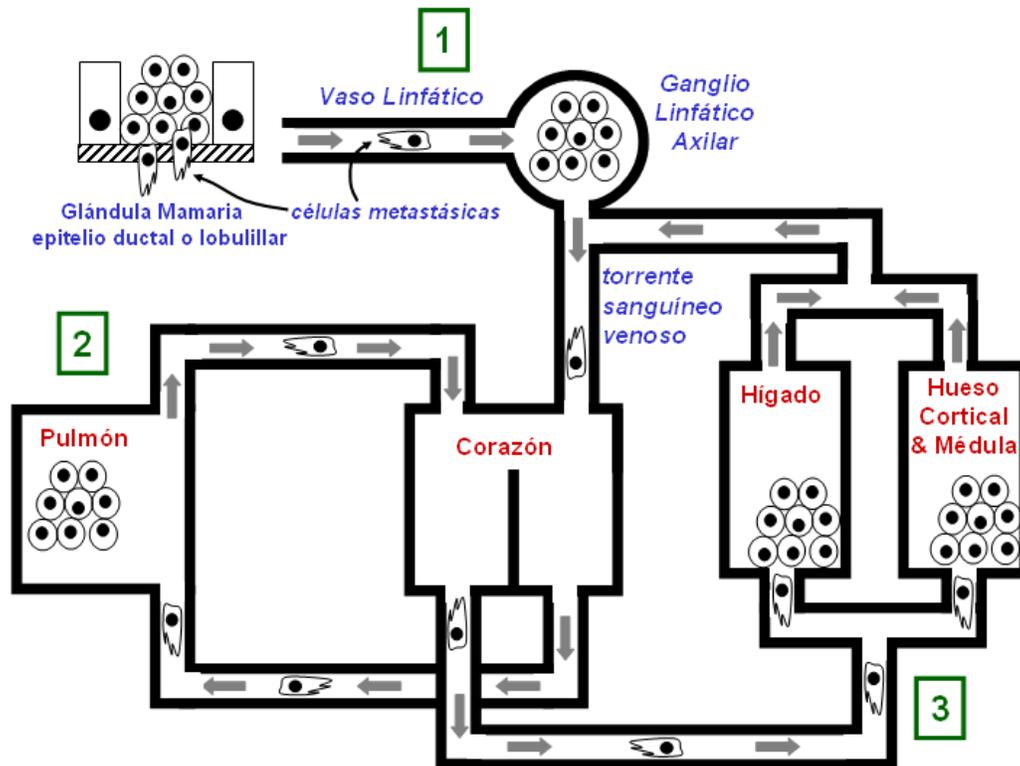


Figura 2. Esquema de la diseminación metastásica de las células de cáncer de glándula mamaria. 1) Las células metastásicas viajan a través de los numerosos vasos linfáticos hacia los ganglios axilares. 2) Después de ingresar al torrente sanguíneo venoso atraviesan el corazón y pasan por el pulmón donde se generan frecuentes crecimientos metastásicos. 3) Si no se establecen en el pulmón, vuelven a atravesar el corazón y con la sangre oxigenada llegan al hígado, al hueso cortical o a la médula ósea.

Mecanismos básicos de la metástasis

¿Qué es lo que guía a las células tumorales para que sin importar su origen sigan una progresión tumoral muy similar que culmina con la metástasis? Esta sigue siendo una gran interrogante que carece de una respuesta clara.

Un paso previo a la transformación celular es la inmortalización, producto de la inestabilidad cromosómica que promueve las aberraciones cromosómicas o las mutaciones puntuales. Actualmente, se considera que la mayoría de estas mutaciones son letales ya que ocurren en genes con funciones esenciales para la vida celular: metabolismo intermediario,

generación de energía, elementos del citoesqueleto, elementos de control del tráfico vesicular, síntesis de proteínas y otros componentes. Sin embargo, las células tumorales que sobreviven quedan sujetas a un proceso de selección donde el microambiente tisular ofrece una serie de restricciones y condiciones favorables que se manifiestan como el tipo de matriz extracelular y los factores solubles características del tejido. Por tanto, se considera que la metástasis se da cuando el microambiente tisular del órgano blanco provee de elementos complementarios a las necesidades de las células tumorales.

Un elemento novedoso ha sido el descubrimiento de que las células tumorales también secretan factores propios del tejido invadido, con lo que se establece una relación de codependencia entre las células metastásicas y el tejido invadido. En el caso de la metástasis ósea por células de cáncer de glándula mamaria, es claro que la expresión de varios componentes de la matriz ósea, como osteopontina, colágena tipo I, y reguladores de la maduración de osteoclastos como osteocalcina y osteoprotegerina son condicionantes de la malignización y la metástasis a hueso [14]. En conclusión, es claro que hay comunicación y codependencia entre las células metastásicas y los órganos que invaden pero aún resta mucho para que tengamos un entendimiento claro del funcionamiento de estas relaciones y de su importancia en el desarrollo de las metástasis. Este concepto tiene su origen en la hipótesis de la "semilla y tierra" ("seed and soil"), propuesta en 1889, por el cirujano inglés Stephen Paget y que destaca que la distribución de las metástasis no se debe a un "fenómeno azaroso", sino que las células tumorales (la "semilla") presentan una "afinidad" o tropismo y dependencia específica por el ambiente de sus órganos blanco (la "tierra"). Esta hipótesis fue rebatida por James Swing (1928) que explicaba la metástasis con base en la estructura anatómica del sistema vascular, posición que prevaleció hasta los años 1970s con los estudios de Sugarbaker (1979). A partir de entonces se considera que las metástasis regionales pueden ser atribuidas a consideraciones anatómicas o mecánicas tales como la circulación venosa eferente o el drenaje linfático hacia ganglios y nódulos linfoides regionales, como ocurre en el cáncer de glándula mamaria, mientras que, las metástasis a órganos distantes son procesos que ocurren en forma órgano-específicos y que requieren de interacciones funcionales [13-15].

La visión clásica de la progresión tumoral postulaba que tanto la adquisición de un fenotipo metastático como las características que determinan la invasión a un órgano en particular se establecen tardíamente cuando el tumor adquiere características malignas. En años recientes los grupos de investigación de Friend, Golup y de Massagué han encontrado evidencia que indica que tanto el potencial metastático como el tropismo hacia uno u otro órgano parecen estar determinados en las etapas tempranas de la progresión, cuando aún es un tumor benigno [16-19]. Hoy en día se considera que el potencial metastático se define en etapas tempranas durante la transformación celular, pero que su manifestación depende en buena medida del fondo genético del individuo afectado. Este escenario contempla entonces a los llamados genes de susceptibilidad, que sin ser elementos causales del desarrollo metastático, si pueden facilitar el proceso [21].

Ha habido avances significativos en el estudio de las bases moleculares de la metástasis órgano-específica en el caso del cáncer de glándula mamaria. El análisis comparativo del patrón de la expresión de células de cáncer por medio de la técnica de microarreglos ha mostrado que las células metastásicas expresan una centena de genes que parecen estar asociados al fenotipo invasivo y al tropismo órgano específico [11,12]. Así, por ejemplo, la sobreexpresión de diferentes combinaciones de epiregulina (EREG), las metaloproteinasas tipos 1 y 2 (MMP1, MMP2) o de la proteína de adhesión vascular (VCAM), junto con otra decena de genes en tumores de cáncer de glándula mamaria en estadio I parecen ser predictivas de metástasis a pulmón. En contraste, la sobreexpresión de interleucina 11 (IL-11), de un receptor de quimiocinas (CXCR4), de la metaloproteinasa 1 (MMP1) y del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 5 (FGF5) junto con otro pequeño grupo de genes predice una metástasis a hueso. Aún queda por determinarse cómo este tipo de resultados puede encontrar una aplicación práctica en la clínica.

La especificidad por ciertos órganos no se deba sólo a la capacidad de interacción entre células tumorales y el endotelio vascular, sino que también involucra la expresión de factores atrayentes tales como quimiocinas y la expresión de sus receptores en las células tumorales. Por ejemplo, se ha encontrado la expresión de receptores de quimiocinas como CXCL12/CXCR4 y CCL21/CCR7 en células metastásicas, [22, 23].

En la actualidad, la búsqueda de una firma molecular que prediga un fenotipo metastático y el tipo de órgano que será invadido y sobre los mecanismos celulares de la adhesión y extravasación llevarán a un mejor entendimiento de las diferentes fases de la metástasis. Se espera que este tipo de estudios permitan establecer y desarrollar mejores estrategias terapéuticas y el desarrollo de fármacos, ya sea para limitar o prevenir la expansión de células tumorales hacia órganos distantes.

Vías de señalización, oncogenes y genes supresores de tumores

Como ya se ha mencionado, la mayoría de los genes alterados en las células tumorales sirven como elementos en las vías de señalización que controlan la proliferación celular. Por el tipo de función que desempeñan en estas vías, se han dividido en dos grandes familias: los oncogenes, que actúan como aceleradores del ciclo celular y los genes supresores de tumores, que actúan como frenos.

Oncogenes y vías mitogénicas

Existen una gran variedad de factores que las activan a través de receptores de siete dominios transmembranales, como ocurre con el oncogen asociado al sarcoma de Kaposi. La proliferación también se estimula a través de receptores con dominios de cinasa de tirosina, como Her2, e incluso a través de receptores nucleares como los receptores de estrógenos, ambos ejemplos importantes en el cáncer de glándula mamaria (Fig. 3). Basta con que uno de los elementos de la vía mitogénica presente una mutación con ganancia de función para que la vía que se encuentra río abajo de estas proteínas se activen, manteniendo un estímulo proliferativo aún sin que haya mas elementos estar mutados. Al analizar los genes mutados en las vías de señalización mitogénicas emerge un patrón inesperado, no todos los productos génicos de las vías de transducción pueden ser mutados con consecuencias oncogénicas. De hecho, la mutación experimental con ganancia de función de genes como Grb2 (del inglés: growth-factor receptor binding proteín 2), de SOS (del inglés: son of sevenless) o de las cinasas dependientes de estímulos mitogénicos (MAPKs) en lugar de inducir un fenotipo oncogénico son letales (Fig. 3). En el cáncer de glándula mamaria el receptor Her2 o de estrógenos tipo alfa ($ER\alpha$) suele encontrarse sobreexpresados. En contraste, otros genes de las vías mitogénicas como las proteínas acopladoras Grb2 y SOS o las enzimas de la cascada de cinasas activadas por mitógenos como (MAPK), nunca han sido identificadas como oncogenes en ningún tipo de cáncer [3, 5-7]. Ras y Raf, elementos de señalización intermedios entre el receptor y las MAP cinasas si han sido identificados como oncogenes, aunque, en el cáncer de glándula mamaria no son mutaciones frecuentes. Dentro de las mitogénicas también se encuentra la cinasa del fosfatidil-inositol 3 fosfato (PI3K) que fosforila a los fosfo-inosítidos generados por la fosfolipasa-C gama ($PLC\gamma$) y que a su vez conduce a la activación de la cinasa Akt. La vía PI3K/Akt que activa vías de supervivencia dependientes del factor de transcripción NF- κ B e inactiva vías apoptóticas al fosforilar a la caspasa-9 y a proteínas como BAD que normalmente neutralizan proteínas antiapoptóticas como BCL X_L al formar heterodímeros con ellas. La cinasa Akt con frecuencia presenta mutaciones con ganancia de función en cáncer de glándula mamaria que hacen que se interfiera con la apoptosis y se expresen genes de supervivencia,

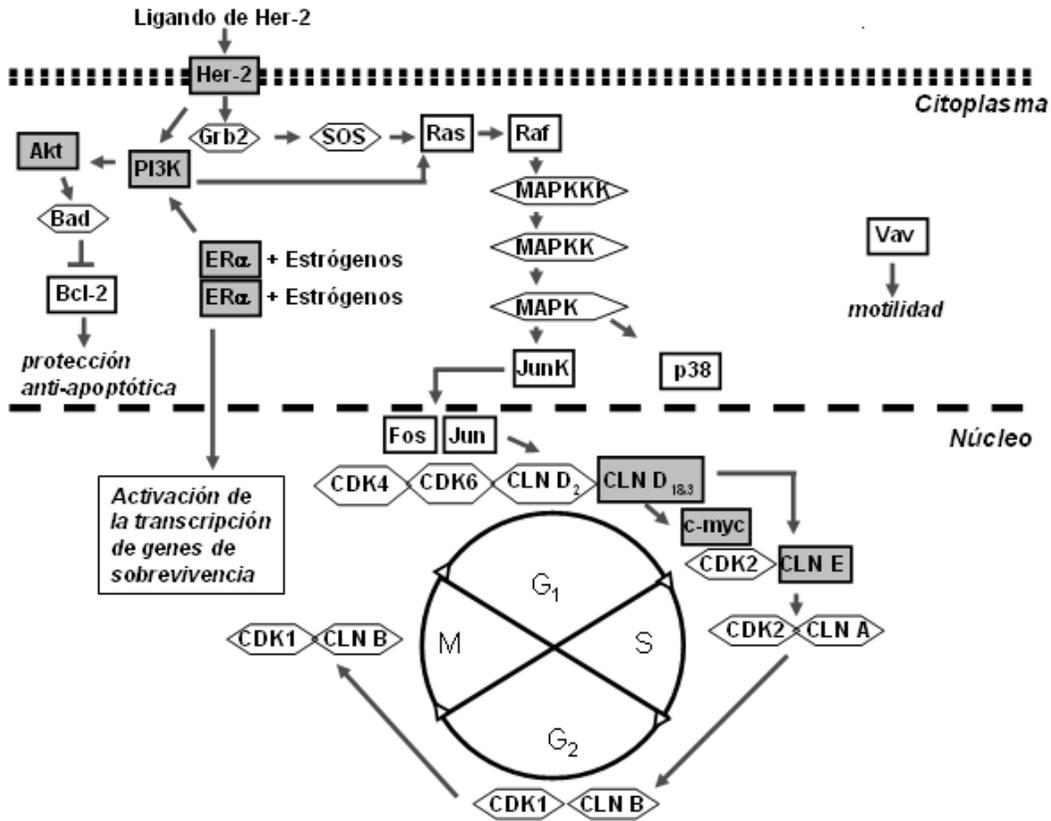


Figura 3. Esquema de la señalización de las vías mitogénicas, motilidad y apoptosis.

Se presenta la vía mitogénica de la familia representada por Her2, un miembro de los receptores de la familia del factor de crecimiento epidermal. Todos los oncogenes se encuentran enmarcados en rectángulos. Los oncogenes que se encuentran mutados frecuentemente en el cáncer de glándula mamaria se encuentran en rectángulos de color gris. Los elementos de las vías mitogénicas que no son protooncogenes están enmarcados en hexágonos blancos. Los efectos inhibitorios están indicados con una línea y una barra vertical. La doble línea punteada en la parte superior representa la membrana celular, la línea punteada en la parte inferior representa la membrana nuclear. Dentro del núcleo se representa al ciclo celular. También se muestran los oncogenes Vav y Bcl-2 asociados a motilidad celular y a la protección contra la muerte celular por apoptosis, respectivamente.

Todas las vías mitogénicas convergen en la activación de la cascada de MAP cinasas que conducen a la activación de enzimas como cinasa del factor de transcripción Jun (JUNK) o p38 que activan la expresión del ciclo celular gracias a la activación de los genes que codifican para las ciclinas D1, D2 y D3. Las diferentes ciclinas D se unen a las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) CDK4 y CDK6 que controlan la progresión de la fase G del ciclo celular. Esto promueve la expresión la ciclina E que se une a CDK2. El complejo ciclina-E/CDK2 fosforila a la proteína de retinoblastoma (Rb) lo que libera al factor de elongación de la transcripción E2F permitiendo la expresión de los genes necesarios para sintetizar desoxi-nucleótidos trifosforilados necesarios para la replicación del material genético. El complejo ciclina-E/CDK2 promueve la síntesis de la ciclina-A que unida a la misma CDK2 dirige la fase S y parte de la fase G2. A su vez el complejo ciclina-A/CDK2 promueve la expresión de la ciclina B que unida a la CDK1 dirige la última fase M con la cual termina el ciclo celular (Figuras 3 y 4). Es comprensible entonces que la sobreexpresión de las ciclinas D1, D3 y E se asocien al desarrollo del cáncer de glándula mamaria. Sin embargo, ni la ciclina D2 ni las cinasas dependientes de ciclinas CDK4, CDK6 o CDK2 se han identificado como oncogenes en este tipo de cáncer.

Se considera que todos los elementos de la vía mitogénica que no participan como oncogenes, como Grb2, SOS, las Mapas, o la ciclina D2, así como las CDKs tienen otras funciones además de su papel en el control del ciclo celular por los que sus mutaciones con ganancia de función son letales.

Genes supresores de tumores y vías antiproliferativas

En la figura 4 se presentan vías anti-mitogénicas que explican el mecanismo por el cual las mutaciones con pérdida de función de los genes supresores de tumores contribuye a una proliferación descontrolada y una mayor acumulación de mutaciones. Por ejemplo, la fosfatasa PTEN (del inglés: Phosphatase and tensin homologue), un gen supresor de tumores asociado a las formas hereditarias del cáncer de glándula mamaria, es el único gen que se ha identificado como antagonista de la vía activada por la cinasa PI3K. En el cáncer de glándula mamaria, las mutaciones de PTEN anulan su función, permitiendo que la vía de PI3K/Akt no pueda ser apagada eficientemente.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es representante de una gran familia de factores con actividad antiproliferativa que se fundamenta en el hecho de que conduce a la expresión de inhibidores de los complejos ciclina/CDK. Entre los inhibidores que son inducidos por esta vía se encuentran las proteínas p21 y p27 (Fig. 4). En la vía del TGF- β los receptores tipo I y II y con los elementos de señalización Smad4 y Smad2 han sido identificados como genes supresores de tumores implicados en el desarrollo del cáncer de glándula mamaria. La disfunción de esta vía trae como resultado que no se expresen los inhibidores de los complejos ciclinas/CDKs que controlan el inicio del ciclo celular, por ende, las células carecen de un freno del ciclo y se dividen descontroladamente.

El ciclo celular se interrumpe cuando hay daño al DNA, este efecto resulta, principalmente, de la expresión de la proteína p53 que a su vez promueve la expresión del inhibidor de CDKs p21. Este bloqueo del ciclo da tiempo para que entren en acción los diferentes sistemas de reparación del material genético. La radiación genera ruptura de doble cadena del DNA, cuya reparación requiere de una serie de proteínas inducidas por radiación (RAD: radiation induced). En el sistema de reparación de daño al DNA generado por ruptura del DNA requiere de las proteínas de la familia RAD52, que reparan la ruptura por medio de recombinación homóloga con la cromátide no afectada. Los sensores de las rupturas del DNA son las proteínas ATM y NBS1, después, RAD52 y RAD51 se asocian al DNA dañado y atraen a una variedad de proteínas de la misma familia RAD para efectuar la reparación. Dentro de las proteínas que se requieren para este proceso de reparación se encuentran las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2 (del inglés BReast CAncer gene 1 y 2 respectivamente). Estos dos genes se asocian a formas hereditarias de cáncer de glándula mamaria y en particular BRCA2 se asocia a cáncer de glándula mamaria, mientras que BRCA1 a cáncer de ovario. El gen mutado de la ataxia telangectasia (ATM) también se asocia a formas hereditarias del cáncer de glándula mamaria pero no a las proteínas asociadas RAD51 o RAD52.

Por lo anterior, en las diferentes vías de transducción participan tanto oncogenes como genes supresores de tumores que están mutados que se han identificado como genes asociados al desarrollo del cáncer.

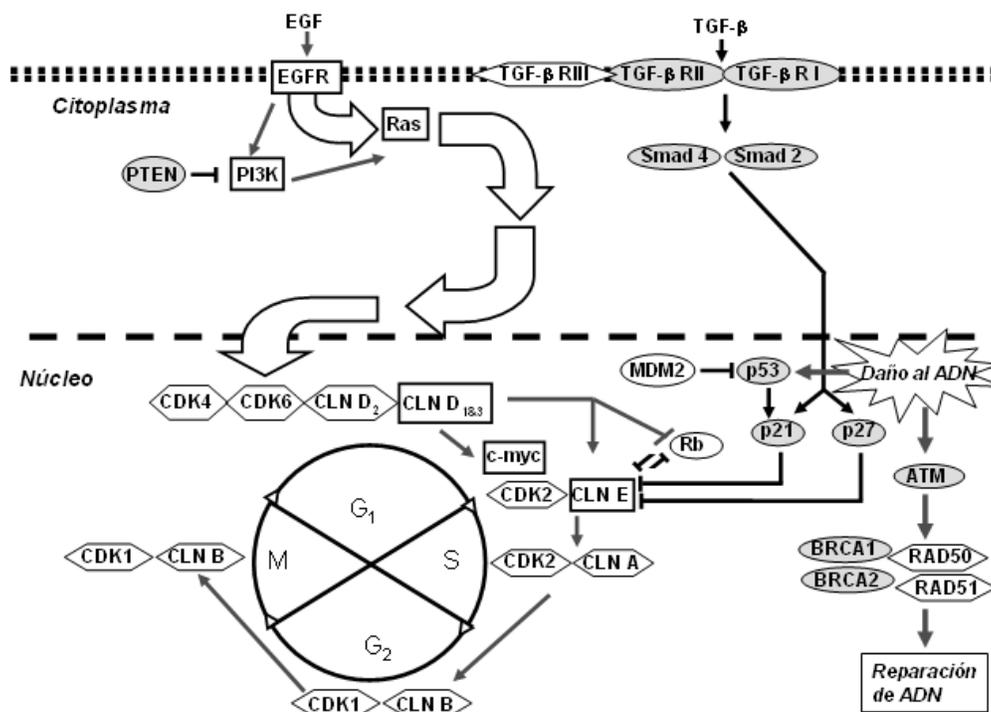


Figura 4. Esquema de la señalización de la vía antimitogénica del TGF-β. La vía mitogénica está representada por el flujo de flechas que van del factor de crecimiento epidermal (EGF) al ciclo celular. En la parte derecha del esquema está representada la vía antimitogénica del TGF-β. Los genes supresores de tumores que se encuentran mutados frecuentemente en el cáncer de glándula mamaria se encuentran en óvalos de color gris. También se muestra al gen supresor de tumores PTEN que antagoniza los efectos de PI3K (parte superior izquierda del esquema). Los efectos inhibitorios están indicados con una línea y una barra vertical. La doble línea punteada en la parte superior representa la membrana celular, la línea punteada en la parte inferior representa la membrana nuclear. Dentro del núcleo se representa al ciclo celular. También se muestran los genes supresores de tumores que participan en la reparación del daño al DNA: ATM, BRCA1, BRCA2 y RAD52 y 51.

Moléculas de adhesión intercelular

Las células que poseen capacidades invasivas y metastásicas presentan alteraciones en la expresión de diferentes clases de moléculas de adhesión que median el anclaje celular a su microambiente. Las proteínas afectadas incluyen: 1. moléculas de adhesión célula-célula (CAMs), principalmente miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y de la familia de las cadherinas, cuya función es regular las interacciones célula-célula y 2. las integrinas, que son responsables de las interacciones célula-matriz extracelular (ECM). Todas estas interacciones de adhesión convergen en vías de señalización reguladoras en la célula [24, 25]. Una de las moléculas de adhesión comúnmente alteradas en melanomas [26] y en otros tipos de tumor (por ejemplo, cáncer de páncreas, de glándula mamaria, gástrico y colorectal, entre otros) [27-29] es la E-cadherina, una molécula homotípica dependiente de Ca^{2+} , responsable de las interacciones célula-célula. Esta proteína se presenta en forma ubicua en las células epiteliales (de donde deriva su clasificación como de tipo "E"). Se ha observado que en muchos carcinomas humanos se disminuye o pierde la expresión o la función de la E-cadherina, como un cambio temprano durante el desarrollo de la progresión metastásica. Esta disminución facilita que las células tumorales se liberen de los contactos de adhesión de las células vecinas y se separen del tejido y de la masa tumoral primaria. Estudios *in vitro*, han indicado que deleciones del dominio

citoplásmico de E-cadherina resultan en una pérdida funcional de la adhesión célula-célula y en un incremento de la movilidad celular. Por otro lado, estudios *in vivo* han indicado que en la mayoría de los tumores de origen epitelial, se pierde la función de la E-cadherina a través de mecanismos que incluyen mutaciones en la región codificante del gen, inactivación del promotor por hipermetilación, o por proteólisis del dominio extracelular y/o citoplasmático de la proteína [30]. Por medio de su dominio intracelular las cadherinas interaccionan con el citoesqueleto de actina a través de adaptadores como las cateninas alfa y beta. La beta catenina en particular juega un papel central ya que actúa como un factor de transcripción. Cuando las células pierden contacto intercelular, la beta catenina se libera y se trasloca al núcleo donde promueve la expresión génica y la proliferación. Esto explica porque mutaciones en el gen de la beta catenina también se encuentran asociadas a este tipo de tumores [31]. La beta catenina juega un papel particularmente importante en la vía de señalización del sistema de receptores WNT/receptores de lipoproteínas en el desarrollo de cáncer de colon. La sobreexpresión de E-cadherina en células de melanoma en cultivo y en modelos de ratones transgénicos, disminuye la capacidad invasiva y de metástasis del tumor, mientras que su inactivación incrementa ambas capacidades [31]. Debido a ello, se ha propuesto que la E-cadherina funciona como un supresor de invasión y metástasis en cánceres epiteliales, y su eliminación funcional representa un paso necesario en la adquisición de esta capacidad [32]. A pesar de lo esperado, las mutaciones en E-cadherina son infrecuentes en los diferentes tipos de cáncer incluyendo el cáncer de glándula mamaria, por tanto se considera que los cambios en su expresión son cambios epigenéticos o adaptaciones transitorias de las células invasivas.

Por otra parte, los cambios en la expresión de integrinas y su afinidad por moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas o por componentes de la ECM, por ejemplo, laminina, colágena, fibronectina, y vitronectina, también son evidentes en células invasivas y metastásicas. Las integrinas son proteínas heterodiméricas que consisten de dos subunidades (α y β) unidas entre sí de manera no covalente. Cada subunidad presenta un dominio extracelular, un dominio transmembranal, y un dominio citoplásmico no catalítico. En algunos tumores la expresión de ciertas integrinas se incrementa, mientras que en otros disminuye.

En cáncer de colon y glándula mamaria, se ha observado una reducción en la expresión y una distribución alterada de las subunidades de las integrinas ($\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 4$, o $\alpha 5\beta 1$). Estas subunidades actúan como receptores de colágena, fibronectina y laminina [33-36].

Los distintos microambientes invadidos influyen en las respuestas de las células malignas. De acuerdo con esto, la colonización exitosa de estos nuevos sitios, tanto distantes como locales, requiere de una adaptación que es lograda a través de cambios en el espectro de las subunidades y de las integrinas, las cuales son expresadas por las células invasoras.

Las células de carcinoma facilitan la invasión mediante un cambio en la expresión de sus integrinas. Así, por ejemplo el cambio de integrinas $\alpha 1\beta 2$ que se unen a la matriz constitutiva de la lámina basal cambia por integrinas $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ preferencialmente a los nuevos componentes de matriz extracelular generados por proteasas extracelulares de las células invasivas [36, 38]. La sobreexpresión de las integrinas normales de la familia $\beta 2$ en las células tumorales bloquea la formación de metástasis, resaltando la importancia del tipo de integrinas que expresa la célula metastásica para su diseminación [35, 38].

El papel de las metaloproteasas de matriz en la invasión y metástasis

En los últimos años, ha aumentado considerablemente el interés en identificar aquellas moléculas involucradas en la degradación proteolítica de la matriz extracelular. Durante el proceso de invasión, las células tumorales tienen que cruzar la matriz intersticial que está compuesta de glicoproteínas, proteoglicanos y proteínas filamentosas. Uno de los principales hallazgos ha sido la participación de diversas cascadas de reacciones proteolíticas en los

procesos de invasión y metástasis [28]. En dichas cascadas participan cuatro clases de proteasas: serin-, cistil-, aspartil-, y metalo-proteasas de matriz (MMPs), siendo estas últimas las más estudiadas, debido a su participación en el paso inicial de la degradación de la matriz extracelular [39].

El rompimiento de las láminas basales y la invasión del espacio intersticial requiere de proteasas de diversas clases, que desde hace ya muchos años han sido estudiadas en células de diversos tipos de cáncer. La gran mayoría de las proteasas son sintetizadas y secretadas en forma de zimógenos inactivos, una excepción son las metaloproteinasas (MMPs) que contienen la secuencia RXKR (Arg-X-Lys-Arg) como la estromelina-3 y las MT-MMPs. Todos los demás zimógenos inactivos son activados en el medio extracelular por un sistema activador de plasminógeno o por otro miembro de la familia de las MMPs. Las MMPs activas están bajo una estricta regulación por inhibidor tisular de las MMPs (TIMPs) o por α_2 -macroglobulina del plasma en una estequiometría 1:1. El balance entre los activadores y los péptidos inhibitorios de las proteasas presentes en el ambiente extracelular determina normalmente los procesos de mantenimiento y la reparación de las matrices extracelulares [39].

Las primeras observaciones acerca de la importancia de las MMPs en la invasión y la metástasis fueron realizadas por Liotta [38], al reportar que una enzima secretada por células de melanoma era capaz de degradar colágena, un componente de las láminas basales. Este descubrimiento fue seguido por numerosos estudios que indican una correlación entre la expresión de MMPs en tumores y su capacidad de invasión y de generar metástasis; por tanto, se ha demostrado un incremento en la expresión de MMP-2 (gelatinasa A, 72 kDa) y de MMP-9 (gelatinasa B, 92 kDa) en diferentes tumores humanos. Ambas MMPs, tienen sus actividades más elevadas en relación al de la colágena tipo IV, el principal constituyente de las láminas basales. Es interesante que a pesar de que existen 9 MMPs han sido la MMP-2 y la MMP-9 las que se encuentran sobreexpresadas con mayor frecuencia en células invasivas.

Otras proteínas que presentan un incremento en diferentes tumores son las colagenasas intersticiales, las estromelina 2 y 3, la matrilisina, y la MT1-MMP [39, 41]. Todas estas enzimas son capaces de degradar moléculas de matriz extracelular (por ejemplo, laminina, fibronectina, y vitronectina, entre otras), proteoglicanos, glicoproteínas y varios tipos de colágena. Además, las células tumorales invasivas también expresan metaloproteasas asociadas a la membrana celular que activan a la gelatinasa B y funcionan como receptores para la gelatinasa A, induciendo de manera eficiente la proteólisis de las proteínas de matriz en toda la zona donde las células hacen contacto (zona pericelular) [42]. En algunos casos el nivel de expresión de estas MMPs se ha correlacionado con el grado de progresión tumoral o estado clínico [39].

Inicialmente se creía que el papel principal de las MMPs era facilitar el rompimiento de las barreras físicas del tejido, promoviendo así, la invasión y entrada de las células tumorales hacia la circulación sanguínea y/o linfática. Sin embargo, recientemente se ha mostrado que las MMPs y sus inhibidores participan en otras etapas de la progresión tumoral. La expresión de estromelina-1 (MMP-3) en la glándula mamaria epitelial es suficiente para inducir el desarrollo de tumores tipo mesenquimales invasivos y esta transición puede ser bloqueada por TIMP-1 [40-42]. Recientemente ha sido posible montar una preparación de venas mesentéricas donde un lente de microscopio permite registrar las imágenes de las células circulantes, ya sea por microscopía de luz visible o incluso con microscopía de fluorescencia. Esta técnica, denominada videomicroscopía intravital ha permitido mostrar que las MMPs beta también son importantes en la creación y el mantenimiento de un ambiente que contribuye al inicio y crecimiento de tumores primarios como en focos metastáticos. Este efecto puede estar mediado por el procesamiento y la liberación de factores de crecimiento asociados con la matriz extracelular como es el caso del TGF- β o del FGF básico o del receptor RAGE (del inglés reportor for advanced glycation end products) [43].

Serina-proteasas

Dentro de la familia de las MMPS se encuentran serina-proteasas que a su vez incluyen a los activadores de plasminógeno. Estos están directa e indirectamente involucrados en la degradación de la matriz extracelular. Los activadores de plasminógeno son proteasas que convierten específicamente el plasminógeno inactivo a plasmina activa, una enzima que tiene una amplia especificidad de sustratos. A través de la plasmina, los activadores de plasminógeno pueden degradar indirectamente una amplia variedad de proteínas, incluyendo fibrina, fibronectina, colágena tipo IV, vitronectina y laminina [44]. La plasmina también tiene la capacidad de activar colagenasa latente y pro-activadores de plasminógeno [45].

Existen dos tipos de activadores de plasminógeno, el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y el activador de plasminógeno tipo tisular (tPA). El tipo urocinasa está involucrado directamente en la degradación de proteínas de matriz extracelular durante procesos de remodelación tisular fisiológica y patológica [46, 47]. Por otro lado, el plasminógeno tipo tisular es una enzima que está involucrada en la disolución de coágulos en los vasos sanguíneos y en el mantenimiento de la homeostasis vascular [48, 49]. Sin embargo, el papel que desempeña el tPA en el desarrollo del cáncer es controversial. Se sabe que este tipo tisular de plasminógeno está ausente en la metástasis de glioblastoma, así como en tumores de colon, pulmón y mama [50, 51]. En el caso de uPA se ha detectado un incremento en su actividad en tumores primarios así como en metástasis de melanoma. La distribución del uPA sobre la membrana celular no es homogéneo encontrándose principalmente en el denominado frente invasivo, que corresponde a los lamelipodios que extienden las células tumorales al avanzar [28].

Por otro lado, en muchos tumores las proteasas que degradan la matriz extracelular, no son producidas por las células tumorales sino por células del estroma y por células inflamatorias [52]. Estas proteasas una vez liberadas, pueden ser manipuladas por células tumorales. De esta forma, las células tumorales pueden inducir la expresión de uPA y su subsiguiente unión al receptor de superficie uPAR produciendo la activación proteolítica del plasminógeno [53-55]. Esta proteasa, como ya se menciona, es capaz de degradar varios componentes de la matriz extracelular directa o indirectamente a través de la activación de metaloproteasas, las cuales subsecuentemente degradan colágenas y otras proteínas de matriz intersticial y de las membranas basales, tales como laminina y fibronectina [56].

Locomoción Activa

Un requisito para que las células tumorales invadan el tejido circundante y la matriz extracelular (ECM) es tener la capacidad de extenderse hacia otros tejidos, también llamada "locomoción activa". Para poder realizarlo las células tumorales utilizan mecanismos de migración similares, si no idénticos, a los que ocurren en células normales durante procesos fisiológicos tales como morfogénesis embrionaria, cicatrización de una herida y durante el tráfico de células inmunes [57]. Estudios recientes indican que la privación de oxígeno podría incrementar la capacidad de motilidad de células tumorales. Se ha encontrado que la hipoxia incrementa la expresión de genes asociados a la migración celular, tales como c-Met, una proteína-receptor que incrementa la motilidad e invasión celular por medio de la unión a su ligando, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) [58]. El oncogen vav, que actúa como una proteína de andamiaje, a la que se unen diferentes efectores de señalización, activa a las proteínas G pequeñas Rac y CD48, que incrementan el recambio del citoesqueleto de actina, un paso esencial para la locomoción activa. En el cáncer de glándula mamaria vav no se encuentra mutado con frecuencia.

Intravasación, arresto y extravasación

Después de haber cruzado exitosamente la matriz extracelular, las células tumorales entran al sistema vascular para diseminarse hacia nuevos órganos, un paso denominado intravasación. Este paso requiere de una secuencia coordinada de proteólisis y locomoción activa. Evidencia reciente indica la existencia de diferencias importantes en la intravasación de células metastásicas y no-metastásicas dentro de un tumor primario. Se ha observado que las células metastásicas se orientan y se elongan hacia los vasos sanguíneos, mientras que las células no-metastásicas se asocian aleatoriamente, y su elongación es independiente de la posición de los vasos sanguíneos. Esto sugiere que la orientación celular puede ser inducida por quimioatracción de los vasos sanguíneos [59].

El análisis estructural de tumores primarios sugiere que, la entrada directa de células tumorales a los vasos sanguíneos está confinada a pequeñas venas, a esta red vascular se le denomina microvasculatura postcapilar. Otros vasos, como las grandes venas, también pueden ser invadidas, pero la invasión arterial es un evento raro [58]. Existen reportes donde se ha demostrado que en algunos tumores (por ejemplo, sarcomas), la sangre es transportada por hendiduras vasculares, las cuales están revestidas por células tumorales, más que por un endotelio. En estos tumores, la invasión no requiere de la degradación previa de las láminas basales. Sin embargo, el proceso de disociación tumoral deberá ser apoyado por la acción de enzimas proteolíticas [58, 61]. En algunos sitios anatómicos y/o en algunos tumores desdiferenciados, las láminas basales pueden ser muy delgadas y estar desprovistas de colágena [62]. Por ejemplo, en el pulmón, el grosor combinado del epitelio alveolar, lámina basal, y endotelio capilar es de solo 100 μm . Además, la neovasculatura tumoral tiende a ser discontinua y presentar aperturas (endotelio fenestrado) por lo que es débil y presenta fácilmente hemorragia, debido en parte a la sobreproducción de VEGF [63]. Asimismo, la intravasación en estos vasos puede requerir mucha menos degradación que la intravasación en vasos normales [62]. Las células tumorales también pueden entrar a la circulación sanguínea en las conexiones linfático-venosas, después de haber entrado a los capilares linfáticos. Interesantemente, ninguna de estas estructuras presenta láminas basales [60]. Sugino y su grupo mostraron que, en algunos modelos, las células metastásicas pueden ganar acceso a los vasos sanguíneos por intravasación de "nidos de células tumorales" rodeados por células endoteliales vasculares, seguido por un crecimiento intravascular del tumor sin la penetración de la pared vascular [63].

En diferentes estudios se ha encontrado que la eficiencia de la invasión vascular tiene un gran impacto en el curso que sigue la progresión metastásica. Es decir, pacientes a los cuales se les detecta invasión de vasos sanguíneos o linfáticos durante la cirugía tienen un peor pronóstico que pacientes sin invasión vascular [74].

Después de haber entrado a la vasculatura, las células tumorales agregadas o individuales evaden diferentes mecanismos de la respuesta inmune (por ejemplo, la acción de linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos y células asesinas NK), y del ambiente vascular, como turbulencia o el sistema de complemento. El flujo sanguíneo o linfático arrastra a las células metastásicas pasivamente hacia órganos y tejidos distantes donde formarán lesiones secundarias. Como ya se mencionó al principio se propone que las células se arrestan en el las venas postcapilares de los órganos blanco. Las células metastásicas se adhieren a las células endoteliales (EC) y a la lámina basal subendotelial, que puede estar expuesta [43, 65, 66].

Observaciones recientes realizadas con microscopía intravital, sugieren que las metástasis se originan a partir del crecimiento intravascular de células tumorales adheridas al endotelio más que de células extravasadas [65-68]. Estos resultados resaltan la importancia de la adhesión intercelular en la metástasis tumoral. No obstante, para que esto se lleve a cabo, se requiere que el endotelio pase de su estado basal o de reposo a un estado activado. Este cambio fenotípico, normalmente presente en la reacción inflamatoria, permite expresar en la superficie

apical del endotelio moléculas de adhesión necesarias para la interacción heterotípica célula tumoral endotelial y que sirve de base para la extravasación tumoral [69-71, 73].

Después de la interacción célula tumoral-endotelio, las células metastásicas se extienden a lo largo de la pared vascular para posteriormente extravasarse hacia el parénquima de los órganos blanco donde finalmente proliferarán mediante pasos secuenciales de proteólisis, adhesión célula-sustrato y locomoción activa. Estos procesos que se llevan a cabo de manera similar a como se realizaron durante los procesos de intravasación e interacción con la matriz extracelular [73, 74].

Cáncer de glándula mamaria

A partir de las observaciones realizadas por Beatson en 1896 sobre la regresión del cáncer de glándula mamaria en pacientes sometidas a la remoción de los ovarios, quedó clara la dependencia hormonal de la enfermedad. Estudios posteriores revelaron que la dependencia hormonal no es un fenómeno generalizado en el cáncer de glándula mamaria, ya sólo entre el 25 y el 40% de los tumores responden favorablemente a la remoción de los ovarios [75]. Esto llevó a la búsqueda de marcadores biológicos que permitieran identificar a este grupo de pacientes con formas de cáncer dependientes de estrógenos y/o progesterona, con lo que se desarrollaron los ensayos inmunohistoquímicos para la identificación de los receptores de estrógenos (ER) y de progesterona (PgR). A partir de este momento, la identificación histopatológica de estos receptores en cáncer de glándula mamaria ha sido una herramienta muy importante en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento [75]. Existen dos isoformas del receptor de estrógenos denominados alfa (de 595 aminoácidos) y beta (con 530 aminoácidos). Comparado con la isoforma ER-alfa, el ER-beta carece de 53 aminoácidos en su extremo amino y 12 en su extremo carboxilo. Normalmente, la isoforma alfa se expresa en los órganos sexuales femeninos incluyendo la glándula mamaria, mientras que la isoforma beta sólo se expresa significativamente en el ovario y en los órganos sexuales masculinos y algunas áreas del sistema nervioso central. La isoforma alfa es la que comúnmente se encuentra en las pacientes con formas de cáncer de glándula mamaria dependiente a hormonas. En la figura 5A se esquematiza la estructura del receptor de estrógenos con sus dominios de unión.

Los receptores de estrógenos actúan tanto a nivel transcripcional promoviendo la expresión de genes que median los efectos a largo plazo como la expresión sostenida de inhibidores de las caspasas como la proteína inhibidora de la apoptosis (IAP-1), así como a nivel citoplásmico, activando cascadas de señalización dependientes de cinasas que median las respuestas inmediatas como la activación de la vía mitogénica. La función como factores de transcripción dependen de la interacción a su ligando en el citoplasma, lo que favorece la unión a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) en el DNA y también a su interacción con coactivadores de la transcripción como SRC-1, SRC-2 o SRC-3 (del inglés *Steroid Receptor Co-activator*), CEBP/p160 (CCAAT/enhancer binding protein). En la figura 5B se esquematiza la unión de un dímero del ER a su ERE y su interacción con coactivadores o SERM (selective estrogen receptor modulator). Estos coactivadores reclutan acetil-transferasas que acetilan residuos de lisinas de las histonas (HATs: histone acetil-transferases) y a los complejos de remodelación de la cromatina SWI/SNF. Paralelamente, estos co-activadores disminuyen la unión de desacetilasas de histonas (HDACs; histone de-acetilase complexes). Todo esto trae como consecuencia un relajamiento de la cromatina favoreciendo la unión de los factores generales de la transcripción y la RNA polimerasa II, con lo que incrementa la frecuencia de inicio de la transcripción [74]. Es interesante notar que recientemente se han identificado mutaciones en la proteína BAF57 asociados al cáncer de glándula mamaria que reducen la interacción entre el ER-beta y los complejos SWI/SNF. La proteína BAF 57 forma parte del núcleo estructural de los complejos de remodelación de la cromatina SWI/SNF, Los efectos citoplásmicos de los receptores a estrógenos, incluyen el incremento de la proliferación celular, y son dependientes de la activación de la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) y de la cascada de

cinastas dependientes de mitógenos (MAPKs). Estos efectos citoplásmicos requieren del coregulador del ER denominado proteína tipo 1 rica en prolina, ácido glutámico y leucina (PELP1/MNAR), que median la interacción entre el ER y sus efectores citoplásmicos como PI3K (77). La dependencia hormonal parece ser un fenómeno complejo que incluye no sólo un estímulo mitogénico sino también la expresión de genes que permiten evadir principalmente estímulos apoptóticos [75-77].

Originalmente, la identificación del receptor de estrógenos es de utilidad en la práctica oncológica y su presencia indica un mal pronóstico. Sin embargo, hoy en día esto ha cambiado gracias al uso de antiestrógenos como el tamoxifen en pacientes de cáncer de glándula mamaria, que suele tener efectos favorables contribuyendo a una regresión del tumor. La administración de anti-estrógenos no resulta eficaz si se administran por periodos prolongados.

El desarrollo de antagonistas de estrógenos llevó a la aplicación de tamoxifen y sus derivados. Estos compuestos se unen al sitio de unión al ligando y permiten la unión del receptor a los elementos de respuesta, pero bloquean la interacción con los coactivadores, por lo que estos compuestos previenen o bloquean la expresión de genes dependientes de estrógenos. Aún se desconoce si existe interferencia con los efectos citoplásmicos, pero es claro que interfiere con la activación de las cinastas dependientes de mitógenos y por tanto con la proliferación celular [77]. En la figura 5C se muestran las estructuras del estradiol y del tamoxifen.

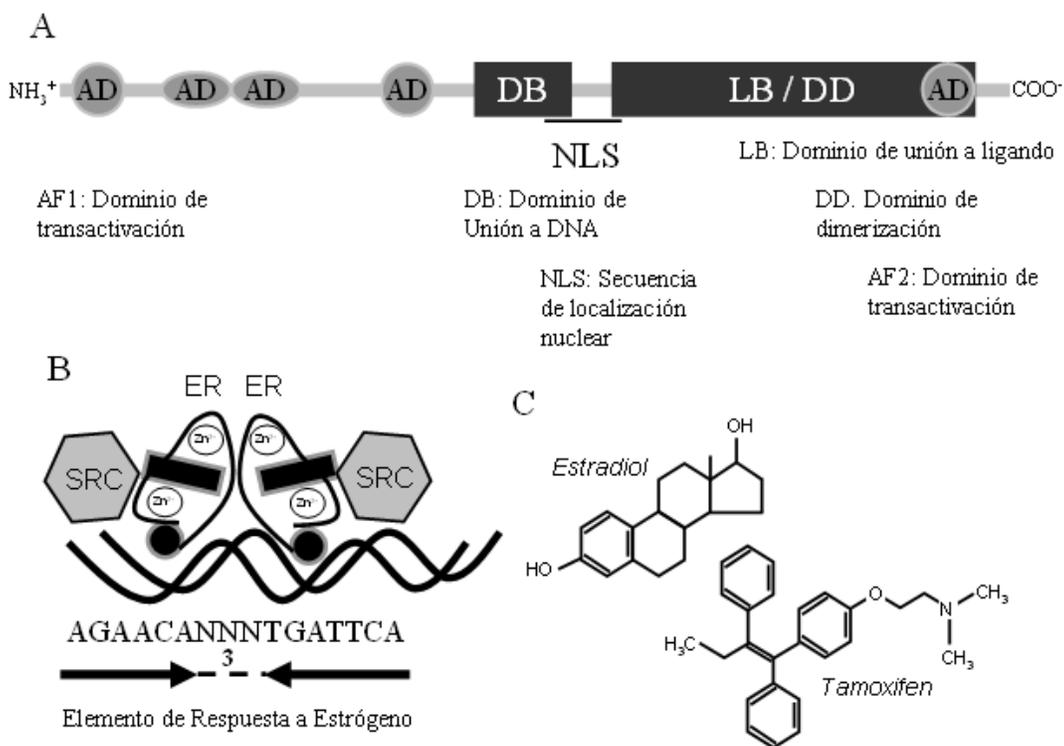


Figura 5. A) Estructura del receptor de estrógenos indicando los diferentes dominios proteicos que lo constituyen. B) Esquema que muestra la unión de un dímero de receptor de estrógenos unido a su secuencia consenso en el DNA y su interacción con coactivadores de receptores de hormonas esteroides (SRCs) El elemento de respuesta a estrógenos corresponde a la secuencia de DNA a la que se une el receptor de estrógenos. En la secuencia de nucleótidos NNN corresponde a cualquiera de los cuatro nucleótidos. C) Fórmulas desarrolladas del estradiol y de su antagonista, el tamoxifen

Nuevas terapias en el cáncer de glándula mamaria

La quimio y radioterapias convencionales seguidas de procedimientos quirúrgicos son eficaces en los estadios I y II pero pierden eficiencia con los estadios más avanzados. Por tanto se han buscado nuevas estrategias terapéuticas, apoyadas en los conocimientos moleculares que se han generado en los últimos años.

La sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento Her-2, como un marcado de mal pronóstico, ha llevado a buscar posibles mecanismos de inhibición de este sistema. Por una parte se han generado anticuerpos neutralizantes del receptor que previenen su activación (trastuzumab). Estos anticuerpos se aplican como una nueva terapia complementaria al taxol o la vinblastina para debilitar al tumor previo a su remoción quirúrgica. Una estrategia alterna ha consistido en generar inhibidores tanto del dominio de cinasa de HER2-Neu como del dominio de cinasa del receptor de PDGF, que también se activa en este tipo de cáncer. Otra perspectiva terapéutica la constituyen los inhibidores de farnesil- y geranil-transferasas como el R115777, que se requieren para la actividad del oncogén ras durante los estímulos mitogénicos y el uso de anticuerpos neutralizantes del factor de crecimiento vascular (VEGF) como bevasizumab o avastin [78]. Habrá que esperar los resultados de los estudios en curso con estas posibles terapias blanco para definir su valor terapéutico en el cáncer de glándula mamaria.

Conclusión

El cáncer de glándula mamaria es un creciente problema de salud pública en nuestro país. Las células de cáncer de glándula mamaria se derivan en su inmensa mayoría de los epitelios ductales o lobulillares. Como en el resto de las enfermedades oncológicas una detección temprana suele tener un buen pronóstico si recibe el tratamiento de quimio- y/o radioterapia adecuado; los procedimientos quirúrgicos actuales también tienen una alta probabilidad de curación. La elevada tasa de mortalidad del cáncer de glándula mamaria en nuestro país se debe principalmente a formas invasivas y metastásicas de la enfermedad. Algunas formas hereditarias se asocian a la sobreexpresión de las ciclinas D1, D3 y E. Uno de los oncogenes asociados a desarrollo de la enfermedad es el receptor HER2/Neu de la familia del receptor del factor epidérmico. En formas avanzadas de la enfermedad suelen encontrarse formas mutadas de ras y la amplificación de c-myc. También se asocia a genes supresores de tumores como p53, ATM, BRCA1, BRCA2 y PTEN. A pesar de los grandes avances en la comprensión de las bases moleculares asociadas al desarrollo del cáncer, aún son pocas las aplicaciones útiles en el tratamiento. Por ejemplo, la expresión del receptor de estrógenos, que originalmente resultaba en un mal pronóstico, hoy puede tener un mejor pronóstico gracias al uso de antagonistas como el tamoxifen. Pacientes con amplificación de HER2/neu hoy pueden ser tratadas con anticuerpos neutralizantes de la actividad mitogénica del receptor. En este momento las herramientas de mayor impacto parecen estar en el campo de la salud pública, como el diseño de campañas orientadas a la detección y atención temprana del cáncer de glándula mamaria, y así prevenir su progresión a formas invasivas de muy difícil tratamiento o a formas metastásicas que se consideran incurables.

Agradecimientos: El Dr. Alejandro Zentella Dehesa agradece la minuciosa y excelente participación de los revisores: la Dra. Ma. Cristina Castañeda Patlán, la Dra. Erika Rendón Huerta y la Dra. Isabel Velázquez López para lograr la versión final del trabajo.

Referencias

1. Ma X, Tucker MA (2005). Epidemiology of Cancer. En: Cancer: principles & practice of oncology, 7ª edición; DeVita V Jr, Hellman S, Rosenberg S editores. Editorial Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia EUA.
2. Britton L, Lacey J Jr, Devesa SS (2002). Epidemiology of breast cancer. En: Cancer of the Breast 5a edición, Donegan WL & Spratt JS editores. Editorial Saunders, Saint Louis Missouri EUA. pp 111-132.
3. Bishop MJ, Hanafusa H (1996). Proto-oncogenes in normal and neoplastic cells. En: Molecular Oncology, Bishop M & Weinberg RA editores. Editorial: Scientific American Inc, New York, EUA. pp: 61-84.
4. Leis JF, Livingston DM (1996). The tumor suppressor genes and their mechanism of action. En: Molecular Oncology, Bishop M & Weinberg RA editores. Editorial: Scientific American Inc, New York, EUA. pp: 111-142.
5. Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
6. Hahn W, Weinberg RA (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2:331-341.
7. Weinberg RA (2001). Cancer: a genetic disorder. En: The molecular basis of cancer 2ª edición, Mendelson J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA editors. Editorial WB Saunders Company. pp: 3-9.
8. Fearon ER, Vogelstein BA (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
9. Fidler IJ (2002). Critical determinants of metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 12:89-96.
10. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Develop* 15:50-65.
11. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. (2002). A gene-expressions signature as a predictor of survival in breast cancer. *New England Journal of Medicine* 347:1999-2009.
12. Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sorlie T, Dai H, He YD, van't Veer LJ, Bartelink H, van de Rijn M, Brown PO, van de Vijver MJ (2005). Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102:3738-3743.
13. Johnson JP (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 1:345-357.
14. Wai PY, Cuo PC (2004). The role of osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res* 121:228-241.
15. Schackert G, Fidler IJ (1988). Site-specific metastasis of mouse melanomas and a fibrosarcoma in the brain and meninges of syngeneic animals. *Cancer Res* 48:3478-3484.
16. Fidler IJ (1995). Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 84:1588-1592.
17. Van't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, Petersen HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530-536.
18. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics* 33:49-54.
19. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordón-Cardo C, Guise TA, Massagué J (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3:537-549.
20. Poste G, Fidler IJ (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283:139-146.
21. Hunter K, Welch DR, Liu ET (2003). Genetic background is an important determinant of metastatic potential. *Nature Genetics* 34:23-24.
22. Auerbach R, Alby L, Morrissey W, Tu M, Joseph J (1985). Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasculature Research* 29:401-411.
23. Liotta LA (2001). An attractive force in metastasis. *Nature* 410:24-25.
24. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogen* 17:1395-1413.
25. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological Reviews* 50:197-263.
26. Giacotti FG, Ruoslahti E (1999). Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032.

27. Johnson JP (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Review* 18:345-357.
28. Behrens J (1999). Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Review* 18:15-30
29. Kurschat P, Mauch C (2000). Mechanisms of metastasis. *Clinical and Experimental Dermatology* 25:482-489.
30. Keleg S, Büchler P, Ludwig R, Büchler MW, Friess H (2003). Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Molecular Cancer* 2:14-20.
31. Strathdee G (2002). Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Seminar in Cancer Biology* 12:373-379.
32. Christofori G, Semb H (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumor suppressor gen. *Trends in Biochemical Sciences* 24:73-76.
33. Birchmeier W, Behrens J (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochemical and Biophysical Acta* 1198:11-26.
34. Hirst R, Horwitz AF, Buck C, Rohrscheinder L (1986). Phosphorylation of the fibronectin receptor complex in cells transformed by oncogenes that encoded tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83:6470-6474.
35. Plantefaber LC, Hynes RO (1989). Changes in integrin receptors on oncogenic cell. *Cell* 56:281-290.
36. Varner JA, Cheresh DA (1996). Integrins and cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 8:724-730.
37. Mizejewski GJ (1999). Role of integrins in cancer: survey of expression pattern. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 222:124-138.
38. Lukashev ME, Werb Z (1998). ECM signaling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends in Cell Biology* 8:437-441.
39. Hood JD, Cheresh DA (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Review Cancer* 2:91-99.
40. Stetler-Stevenson WG, Yu AE (2001). Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Seminar in Cancer Biology* 11:143-152.
41. Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR (1979). Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76:2268-2272.
42. Nelson AR, Fingleton B; Rothenberg ML, Matrisian LM (2000). Matrix metalloproteinases: biological activity and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* 18:1135-1149.
43. Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, Fuller GN, Seiki M, Sato H, Gokaslan ZL, Liotta LA, Nicolson GL, Rao JS (1996). Differential expression of membrane type matrix-metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. *Cancer Research* 56:384-392.
44. Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Koop S, Morris VL, Khoka R, Groom AC (1995). Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Reviews* 14:279-301.
45. Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt N, Lund LR, Dano K, Apella E, Blasi F (1990). Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO Journal* 9:467-474.
46. Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R (1991). The effect of plasminogen activators (urokinase), plasmin and trombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Research* 41:4629-4636.
47. Saksela O, Rifkin DB (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annual Review in Cell Biology* 4:93-126.
48. Blasi F (1993). Molecular mechanisms of protease-mediated tumor invasiveness. *Journal of Surgery and Oncology, Supplement* 3:21-23.
49. Bachmann F, Kuitfh IE (1984). Tissue plasminogen activator: chemical and physiological aspects. *Seminar in Thrombosis and Hemostasis* 10:6-17.
50. Gething MJ, Adler B, Bosse IA, Gerard RD, Madison EL, McGookey D, Meidell RS, Roman LM, Sambrook J (1988). Variants of tissue type plasminogen activator that lacks specific structural domains of heavy chain. *EMBO Journal* 7:2731-2740.
51. Hajjar KA, Hamel NM (1990). Identification and characterization of human endothelial cell membrane binding-sites for tissue plasminogen activator and urokinase. *Journal of Biological Chemistry* 265:2908-2916.
52. Saito K, Nagashima M, Iwata M, Hamada H, Sumiyoshi K, Takada Y, Takada A (1990). The concentration of tissue plasminogen activator and urokinase in plasma with ovarian and uterin tumors. *Thrombosis Research* 58:355-366.

53. Werb Z (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91:439-442.
54. Stoppeli MP, Corti A, Soffientini A, Cassani G, Blasi F, Assoian RK (1985). Differentiation enhancer binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82:4939-4943.
55. Vassalli JD, Baccino D, Belin D (1985). A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *Journal of Cellular Biology* 100: 86-92.
56. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brünner N, Jänicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putten WLJ, Klijn JGM (2000). The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer research* 60:636-643.
57. Mignatti P, Rifkin DB (1993). Biology and biochemistry of proteases in tumor invasion. *Physiological Reviews* 73:161-195.
58. Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
59. Pennacchietti S, Michieli P, Gallazo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met proto-oncogene. *Cancer Cell* 3:347-361.
60. Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS, Segall JE (2000). A critical step in metastasis: in vivo analysis of intra-vascular invasion at the primary tumor. *Cancer Research* 60:2504-2511.
61. Weiss L (1989). Biomechanical destruction of cancer cells in skeletal muscle: a rate-regulator for hematogenous metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis* 7:483-491.
62. Weiss et al, 1983.
63. Weidner N (2002). New paradigm for vessel invasion by tumor cells. *American Journal of Pathology* 160:1937-1939.
64. Sugino T, Kusanabe T, Hoshi N, Yamaguchi T, Kawaguchi T, Goodison S, Sekimata M, Homma Y, Susuki T (2002). An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis: a new murine mammary tumor model. *American Journal of Pathology* 160:1973-1980.
65. Gabbert HE, Meier S, Gerharz CD, Hommel G (1991). Incidence and prognostic significance of vascular invasion in 529 gastric cancer patients. *International Journal of Cancer* 49:203-207.
66. Thorlacius H, Prieto J, Raud J, Gautam N, Patarroyo M, Hedqvist P, Lindbom L (1997). Tumor cell arrest in the microcirculation: lack of evidence for a leucocyte-like rolling adhesive interaction with vascular endothelium in vivo. *Clinical Immunology and Immunopathology* 83:68-76.
67. Glinsky GD (1998). Anti-adhesion cancer therapy. *Cancer Metastasis Reviews* 17:177-185.
68. Orr FW, Wang HH (2001). Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis. *Surgical Oncology Clinics of North America* 10:357-381
69. Al-Mehdi AB, Tozawa T, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation from endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nature Medicine* 6:100-102.
70. Lollini PL, De Giovanni C, Nocoletti G, Bontadini A, Tazzari PL, Landuzzi L, Scotlandi K, Nanni P (1990). Enhancement of experimental metastatic ability by tumor necrosis factor alpha alone or in combination with interferon gamma. *Clinical and Experimental Metastasis* 8:215-224.
71. Orosz P, Echtenacher B, Falk W, Rüschoff J, Weber D, Männel DN (1993). Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine* 177:1391-1398.
72. Stoelcker B, Hafner M, Orosz P, Nieswandt B, Männel DN (1996). Role of adhesion molecules and platelets in TNF-induced adhesion of tumor cells to endothelial cells: implications for experimental metastasis. *Journal of Inflammation* 46:155-167.
73. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan M, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A (2001). Involvement of chemokine receptor in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.
74. Engers R, Gabbert HE (2000). Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *Journal of Cancer research and Clinical Oncology* 126:682-692.
75. Chang M, Liu H, Jordan VC (2002). Hormonal and growth factors. En: *Cancer of the Breast 5a edición*, Donegan WL & Spratt JS editores. Editorial Saunders, Saint Louis Missouri EUA. pp:417-444.
76. Butt AJ, MacNeil CM, Musgrove EA, Sutherland R (2005). Downstream targets of growth factor and oestrogen signaling and endocrine resistance: the potential roles of c-myc, cyclinD1 and cyclin E. *Endocrine-Related Cancer* 12:S47-S59.
77. Nair S, Vadlamudi RK (2007). Emerging significance of ER-corregulator PELP-1/MNAR in cancer. *Histology and Histopathology* 22:91-96.

78. Kaklamani V, O'Regan MR (2004). New targeted therapies in breast cancer. *Seminars in Oncology* 31:20-25.

Semblanza del Dr. Alejandro Zentella Dehesa



Nació en 1957 y creció en el seno de una familia de maestros normalistas de primaria y secundaria. En 1976 inició la carrera de biología experimental en la UAM-Iztapalapa y paralelamente se inició en la investigación en bioquímica bajo la dirección del Dr. Enrique Piña Garza, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM donde inició su vida académica en la UNAM como ayudante de profesor. Sus primeros trabajos se enfocaron al estudio de las alteraciones de la ureagénesis en el hígado profundido asociados a la intoxicación alcohólica. En 1991 pasó un año con el Dr. Lourival D. Possani en el Instituto de Investigaciones Biomédicas donde participo en proyectos dedicados a la síntesis de péptidos en fase sólida ingresó al doctorado en bioquímica en la Universidad Rockefeller en Nueva York bajo la dirección del Dr. Anthony Cerami con una beca de la Universidad Rockefeller. Obtuvo su doctorado en bioquímica (PhD) en junio de 1989 con su trabajo dedicado al estudio de la activación de ciclos inútiles en cultivos de músculo esquelético de rata expuestos a la cacectina/factor de necrosis tumoral alfa (TNF). De 1989 a 1993 obtuvo su entrenamiento posdoctoral bajo la dirección del Dr. Joan Massagué en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Memorial Sloan Kettering Cancer Center en Nueva York con una beca del Howard Huges Medical Institute. Ahí realizó estudios de ciclo celular estudiando las posibles aplicaciones anti-tumorales del factor de crecimiento transformante beta. En 1993 gracias al apoyo del Dr. Antonio Peña Díaz y del Dr. J. Adolfo García Sainz ingresó al Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM como investigador titular. Ahí se desarrolló como investigador independiente y estableció sus líneas de trabajo sobre apoptosis, activación de células endoteliales humanas y la activación del sistema NF-kB. En 2004 con el apoyo de los Dres. Fernando Gabilondo Navarro, J. Adolfo García Sainz, Juan Pedro Laclette y Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte se transfirió al Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM como jefe de la unidad periférica Guillermo Soberón Acevedo y encargado del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Ahí a continuado su trabajo sobre las interacciones funcionales y físicas del endotelio vascular y células metastásicas de cáncer de glándula mamaria. En los últimos años su trabajo se ha centrado en la comprensión de las bases moleculares de las disfunciones celulares asociadas al cáncer de glándula mamaria. Cuenta con 42 artículos de investigación publicados en revistas internacionales indizadas, 17 revisiones, editoriales y comentarios en revistas nacionales, 7 capítulos de libros y 23 participaciones ponencias y 93 carteles en congresos nacionales, 20 carteles en congresos internacionales y 72 conferencias por invitación. Hasta el 2001 sus publicaciones internacionales habían sido citadas más de 2000 veces en la literatura científica de su área. Ha dirigido 3 tesis de licenciatura, 5 de maestría y 5 de doctorado. Ha sido cotutor de 100 alumnos de posgrado de la UAM, del CINVESTAV y de la UNAM. Ha impartido 33 cursos especializados, de licenciatura y posgrado y ha participado como profesor invitado en 41 cursos de posgrado. Ha sido miembro estudiante y numerario de la Sociedad Mexicana A.C. de Bioquímica (SMB) desde 1979 y a fungido como secretario tesorero de la misma. Ha sido presidente de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica A.C., y es miembro del comité editorial de la Revista de Educación Bioquímica. También es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SIN-nivel II) y de la Academia Nacional de Medicina.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

EL APRENDIZAJE BASADO EN PROBLEMAS EN EL DESARROLLO Y ADQUISICIÓN DE COMPETENCIAS EN CIENCIAS DE LA SALUD.

Norma Lucila Ramírez López.
Secretaría de Educación Médica, Facultad de Medicina, UNAM.
Av. Universidad # 3000 Col. Copilco Universidad,
Delegación Coyoacan, C. P. 04520. Distrito Federal México.
norram@prodigy.net.mx

Resumen

Actualmente, en las instituciones educativas se llevan a cabo diversas actividades de enseñanza-aprendizaje bajo los fundamentos de la corriente constructivista, tal es el caso de la metodología del aprendizaje basado en problemas. Esta es una estrategia de aprendizaje significativo centrada en el estudiante, en el que se promueve una actitud positiva hacia la adquisición de los diferentes tipos de competencias, que los estudiantes deberán mostrar y aplicar, al final de su formación, de manera exitosa en el desempeño profesional. La educación basada en competencias forma al educando mediante una metodología de enseñanza que enfatiza el saber hacer en el contexto en el que efectuará las competencias; está centrada en desempeños y resalta las situaciones en donde dicho desempeño es relevante.

Para realizar el abordaje del aprendizaje basado en problemas es necesario definir sus fundamentos, las características, los procesos como se lleva a cabo y su evaluación; así como el papel que desempeña el profesor y el alumno. Con respecto a la educación basada en competencias es importante especificar los desempeños necesarios, así como determinar sus componentes y niveles de realización e identificar los procedimientos que permitirán su alcance y los mecanismos de evaluación de las competencias logradas.

Palabras clave: Metodología de aprendizaje basado en problemas, metodología de enseñanza aprendizaje, competencias.

Abstract

At the present time, educational institutions are carried diverse activities out of teaching-learning under the constructivist school of thought, such is the case of learning based upon problems methodology that it is used like a strategy of significant learning centered in the student, in which a positive attitude is promoted toward the acquisition of different types of competitions, same that the students should show and apply at the end of their formation, in a successful way in the professional performance. The education based on competitions form to the pupil by means of a teaching methodology that emphasizes the knowledge to make in the context in which competitions shall be effected; this centered in performances and highlights the situations where said performance is exceptional.

To carry out the boarding of learning based on problems, it is necessary to define the foundations, characteristics, the process how it will be taken to effect its evaluation, as well as the role that carries out the professor and the student. With regard to the education based on competitions it is important to specify the necessary competitions, as well as to determine their components and realization levels and to identify the procedures that will allow their scope and the mechanisms of evaluation of the achieved competitions.

Keywords: Learning based upon problems methodology, education based on competitions, activities out of teaching-learning.

Introducción

Uno de los actos que el estudiante y el profesionista realizan es el razonamiento, ya sea bioquímico, farmacológico, médico o de algún otro campo, para ello se llevan a cabo procesos cognitivos que permiten identificar, estructurar y organizar los elementos para evaluar y manejar problemas, en forma adecuada, precisa y oportuna; el aprendizaje de este proceso se realiza mediante la interacción con pares, contenidos, maestros y situaciones reales o simuladas con las que habrá de enfrentarse el estudiante en su práctica real.

De aquí la importancia de emplear al aprendizaje basado en problemas como una metodología de enseñanza-aprendizaje, que atiende a las necesidades actuales de formación y adquisición de conocimientos y habilidades, en ambientes de estudio. Involucran a los estudiantes en un proceso activo de aprendizaje tanto independiente como grupal, guiados por el docente quien facilita y orienta el proceso.

Esta metodología tiene una estrecha relación con el desarrollo de los dominios requeridos para una certera toma de decisiones, según el área académica y nivel al cual se dirija. Se favorece la adquisición de un sistema de conocimientos conceptuales y de procedimientos, organizados en esquemas operacionales, que se pretende que obtengan los alumnos en situaciones específicas de determinado nivel de realización; esto es mediante la identificación de problema(s) y su resolución por una acción eficaz, con lo cual los estudiantes podrán desempeñarse en un nivel académico superior, de acuerdo con el nivel de competencia logrado.

Existe una diversidad de definiciones y clasificaciones de competencia, para la Organización Internacional del Trabajo, la competencia laboral es la construcción social de aprendizajes significativos y útiles para el desempeño en una situación real de trabajo, que se obtiene no solo de la instrucción, sino también mediante la experiencia en situaciones concretas de trabajo. Otro abordaje es el de Mertens (1997), para quien la competencia se refiere a ciertos aspectos del acervo de conocimientos y habilidades, necesarios para obtener determinados

resultados exigidos en una circunstancia dada, lo cual implica la combinación de conocimientos generales y específicos con experiencias de trabajo.

Mertens (1997) señala cuatro ventajas de un plan de estudios orientado a la resolución de problemas: a) se toma en cuenta la forma de aprender; b) se concede mayor importancia a la forma en que se aprende que a la asimilación de conocimientos; c) se logra mayor pertinencia que en el enfoque basado en disciplinas o especialidades, y d) se logra mayor flexibilidad que con otros métodos. Otra ventaja es la posibilidad de ofrecer una formación individualizada mediante módulos, lo que permite a los estudiantes avanzar progresivamente en la adquisición de niveles de competencia. Se asume que las necesidades de aprendizaje varían según cada país y cada cultura; se definen en función de la región, ya sea rural o urbana, o de la relación entre comunidades, educación y empleo.[1].

Orígenes

Uno de los fundamentos teóricos del aprendizaje basado en problemas es el constructivismo [2], como parte de las teorías de la psicología cognitiva. Piaget, aporta a este respecto que el aprendizaje es un proceso de formación de estructuras de pensamiento a partir de la interacción del individuo con el ambiente, después de que la nueva información genera un conflicto cognitivo, que requiere de la asimilación y acomodación, con base en un conocimiento previo y relevante para el individuo, modificándose con ello tanto estructuras como conocimientos [2].

Otra aportación relevante es la de Vigotsky, quien señala la importancia de la relación del individuo con su entorno social y cultural en el que se ha desarrollado; su teoría incluye la zona de desarrollo proximal en la que la respuesta de un individuo ante una situación determinada es diferente cuando la da solo a cuando la da ayudado por alguien con más experiencia o conocimiento [2].

Ausubel tiene como contribución el aprendizaje significativo en el que se incorpora al conocimiento previo un nuevo contenido, para lo cual se requiere que este último sea claro, además de la motivación y el esfuerzo del estudiante, quien logra un conocimiento nuevo y duradero, del cual podrá disponer en el futuro. Dicho aprendizaje tiene como ventaja una retención perdurable de la información, facilita nuevos aprendizajes relacionados y produce cambios profundos o significativos, a través de un sistema jerárquico de interrelaciones [2].

En relación con el concepto de competencias en el área académica, éste tiene sus fundamentos en la psicología cognitiva, los planteamientos de Piaget y Vigotsky, así como la teoría de Bloom, quien propone tres objetivos en educación: el desarrollo cognoscitivo, afectivo y psicomotor, lo cual lleva a la reflexión de la importancia de la formación y evaluación de estos tres criterios [2].

Cabe señalar que los sistemas de salud están inmersos en la formación de recursos humanos basada en competencias que deben adquirir para su desempeño profesional. El tema no es nuevo, internacionalmente se le ha prestado atención desde las dos últimas décadas del siglo pasado. La Organización Internacional del Trabajo, la Organización Mundial y Panamericana de la Salud, la Federación Panamericana de Asociaciones de Facultades de Medicina y Cooperación Iberoamericana para el Diseño de Formación Profesional, entre otras, han visto en la formación por competencias una aproximación más real a las necesidades del desempeño de la persona en la práctica cotidiana.

La meta institucional del Programa de Formación en Salud Internacional es contribuir al fortalecimiento de la capacidad de cooperación de los países y regiones, para mejorar los niveles

de salud de sus poblaciones, promover el desarrollo social y económico mediante la formación de líderes en salud internacional. El programa elaborado en 1985 contempla como marco de referencia para esta propuesta educativa, 3 componentes fundamentales:

1. La salud internacional campo de práctica y de desarrollo.

Los participantes en el programa deben tener conocimientos y experiencia en salud pública, en sus 5 divisiones: control y prevención de enfermedades, desarrollo humano y de la salud, protección y promoción de la salud, desarrollo de sistemas y servicios de salud y el programa especial de vacunas e inmunizaciones.

2. Las competencias esenciales en salud internacional. Para el programa son las siguientes:

- Competencias básicas: capacidad de expresarse adecuadamente en forma escrita y verbal, dominio de idiomas, computación básica, organización del tiempo y del trabajo.

- Competencias específicas o especializadas: son las relativas al campo disciplinario, de formación y de experiencia del participante.

- Competencias esenciales: liderazgo, consultoría y cooperación.

3. Las principales estrategias educativas. El programa de formación en salud internacional propone tres estrategias para el desarrollo de las competencias esenciales en salud internacional:

- La inserción en el trabajo de la organización. El participante se enfrenta a una serie de tareas y demandas, por lo cual se le exige la comprensión de la realidad y adecuación de sus modelos, representaciones y saberes para una inserción exitosa y una contribución efectiva.

- El tutor. Tiene como función la de guiar, orientar y asesorar al participante, además de facilitar su integración a las actividades a desarrollar.

- El trabajo de grupo. Los participantes conforman un grupo de aprendizaje que contribuye al desarrollo de las competencias esenciales. Favorece el debate sobre dinámicas de organización, en contacto con la realidad; promueve un intercambio de experiencias y conocimientos, con nuevas experiencias comunes. El trabajo de grupo plantea temas fundamentales relacionados con la salud internacional: la cooperación técnica y financiera en salud; las instituciones activas en salud del sistema internacional, las tendencias nacionales y regionales relevantes para la salud; el análisis comparativo en salud, la formulación de políticas en salud, el desarrollo de proyectos y la negociación entre otros [3].

Con respecto al concepto de competencia en su acepción holística, se plantea como un complejo estructurado de atributos generales—conocimientos, actitudes, valores y habilidades—requeridos para interpretar situaciones específicas y desempeñarse en ellas de manera eficaz, considerando el contexto y la cultura del lugar de trabajo. Desde un abordaje cognitivo, toma en consideración los procesos mentales desarrollados para conformar el logro de la competencia de un individuo [4].

Metodología

Al enfrentarse a situaciones problemáticas se adquieren experiencias de aprendizaje de información y conocimientos significativos y por ello tienen menos probabilidad de olvidarse y pueden aplicarse en situaciones similares en el futuro. Es importante tomar en consideración que los escenarios que se elaboren o elijan tengan congruencia con los contenidos por abordar en el programa de estudios de la(s) asignatura(s).

La metodología del aprendizaje basado en problemas se realiza con la finalidad de lograr aprendizajes en colaboración esto es mediante grupos pequeños de estudiantes que analizan, discuten un problema y definen las metas grupales bajo la guía y orientación de un tutor, se respeta la autodirección del aprendizaje ya que son los estudiantes quienes establecen los objetivos de estudio de los temas que se desconocen o se pretende profundizar; el propósito es realizar un trabajo colaborativo, a través de la realimentación entre los participantes, sobre los aprendizajes, fuentes y tareas compartidas. El éxito de un alumno ayuda a que sus compañeros también tengan éxito.

El aprendizaje compartido brinda la oportunidad a los alumnos de discutir sus ideas y razonar de manera crítica. Cabe destacar la importancia de la habilidad tutorial para el buen funcionamiento de los equipos de alumnos. El docente participa activamente en la planeación y secuencia de los problemas a través de la realimentación inmediata y la evaluación continua de los alumnos, de modo que ayude a cubrir los objetivos curriculares [5].

El proceso de la metodología del aprendizaje basado en problemas se realiza:

En una primera fase en torno a la interpretación, análisis y discusión de un escenario que se presenta en el contexto real, para posteriormente definir el o los problemas, identificar las pistas que se encuentran en torno a éste y que permitirán generar hipótesis y formular objetivos de aprendizaje con base en las deficiencias detectadas.

En la segunda fase se da paso a las actividades tanto de búsqueda crítica de información en libros, revistas, bases de datos y opiniones de expertos; como de estudio independiente con la finalidad de atender a los objetivos establecidos por el grupo, corroborar o replantear el problema, las pistas y las hipótesis, con lo cual cada uno de los estudiantes genera un reporte.

En una tercera fase se presenta el reporte obtenido de la búsqueda de información al resto del grupo y dar paso al inicio de una nueva discusión, para revalorar el escenario con base en la información que cada uno de los integrantes del grupo obtuvo. En esta fase puede entregarse al grupo una segunda parte del escenario con datos complementarios que permitirán nuevamente dar inicio a las tres fases señalados anteriormente hasta obtener como resultado final la solución del problema. Sin embargo, la adquisición más importante es la elaboración de toda la serie de razonamientos y la adquisición de una nueva competencia que permitirá aplicar lo ya conocido a una situación nueva. Lo anterior refleja la adquisición de competencias en cuanto al dominio de contenidos, al trabajo grupal y colaborativo y a la búsqueda de información.

Durante el desarrollo de la metodología de aprendizaje basado en problemas los estudiantes realizan actividades al enfrentarse con el escenario planteado, las cuales contribuyen a la adquisición de competencias básicas, como por ejemplo la interpretación y análisis de los datos, la búsqueda certera de información, así como la lectura crítica y la generación de un reporte sobre la misma. Así como competencias esenciales como la participación y comunicación efectiva en el trabajo que realizan en forma grupal. Además de ejercitar no solo la metodología de los procesos cognitivos sino que estos se orientan a la adquisición del razonamiento la disciplina en la que se emplea dicha metodología como

elemento importante para la realización de un desempeño que conlleva la adquisición y dominio de competencias específicas.

Al referirnos a la competencia es conveniente señalar que tiene dos características esenciales: a) está centrada en desempeños y b) resalta las situaciones o contextos donde dicho desempeño es relevante o útil. El desempeño es la expresión concreta de los recursos empleados por un individuo cuando lleva a cabo una actividad; misma que es realizada en un contexto específico. La persona además de disponer de destrezas (habilidades y conocimientos) debe ser capaz de utilizarlas según las condiciones y demandas del medio.

Es importante señalar que la competencia es una unidad en sí misma, por lo que solo tiene sentido como totalidad, aunque puedan desagregarse los componentes por separado no constituyen una competencia, puesto que en esta se encuentran incluidos un conjunto de saberes, habilidades y actitudes [6].

En la figura 1 se muestra los niveles de competencia análogos a la teoría de Ausubel, quien propuso que el aprendizaje depende de dos variables complementarias que son continuas: el aprendizaje realizado por el alumno y la estrategia de instrucción realizada por el docente.

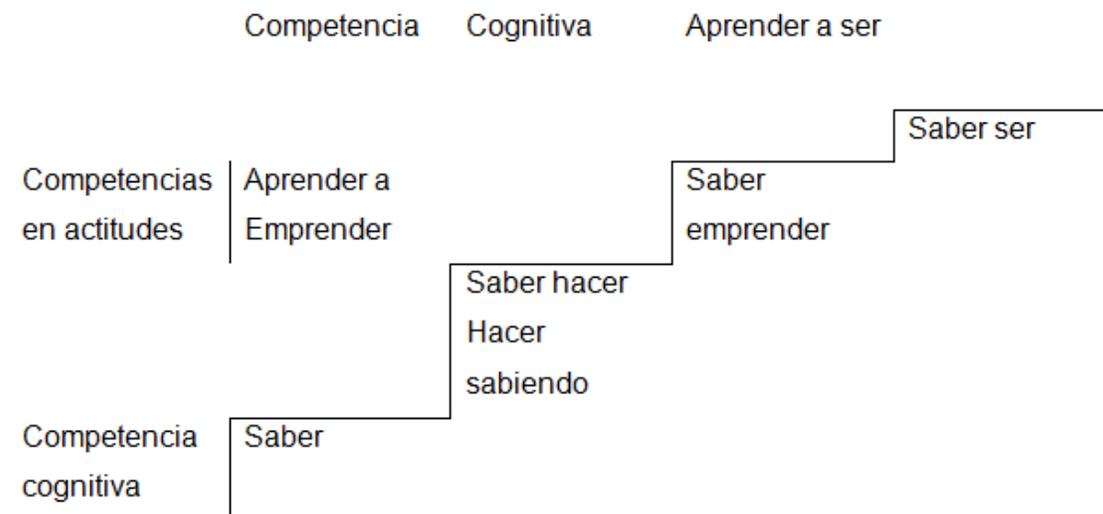


Figura 1. Niveles de competencia en donde el conocimiento y la actitud se integran en el actuar, en el saber ser.

Es importante considerar el proceso general de normalización de competencias, en el cual se pueden describir varias etapas generales: conceptualización, que se realiza en un acercamiento al campo de trabajo; análisis funcional, que es una metodología de organización de la información ocupacional; normalización de competencias, que comprende las funciones que a determinado nivel ya pueden ser cumplidas por personas capaces de realizarlas.

Las competencias se pueden detallar en varios apartados, tales como:

- I. Relacionadas con las acciones esperadas por el profesionista
 - A. Competencias técnicas

1. Aplicación de habilidades de razonamiento y de ejecución práctica a la identificación de problemas y elaboración de hipótesis
 2. Manejo de recursos de apoyo
 3. Manejo de opciones de solución
 4. Prevención del problema
 5. Comunicación efectiva
 6. Aplicación de habilidades para el manejo de información
- II. Relacionadas con la forma en que se realizan las acciones
- B. Competencias intelectuales
1. Aplicación de conocimientos adquiridos durante la formación a la práctica profesional
- C. Competencias analíticas y creativas
1. Razonamiento y toma de decisiones
- III. Relacionadas con el profesionalismo
- D. Competencias emocionales, personales y profesionales
1. Desempeño del profesionista en el sistema de salud
 2. Desarrollo personal, incorporación de actitudes y bases éticas.

Evaluación

Es conveniente tomar en consideración que este es uno de los apartados que debe fortalecerse en el aprendizaje basado en problemas, la evaluación se realiza en todos los momentos en que se lleva a cabo la metodología, por lo que se evalúa los aprendizajes logrados, la sesión, el tutor, el desempeño del grupo y del individuo. Para esta evaluación puede utilizarse el portafolio de evidencias de aprendizaje, listas de cotejo con criterios de referencia, examen escrito, autoevaluación y realimentación, esto es mediante el desempeño a través de productos tangibles o acciones observables que revelen los grados de eficiencia basados en criterios establecidos en relación a lo que se espera que los estudiantes conozcan o sean capaces de hacer, para ello se seleccionan los métodos más apropiados, validos y confiables.

Puesto que evaluación en el aprendizaje basado en problemas se lleva a cabo durante todo el proceso, es conveniente señalar que para la evaluación de los aprendizajes de contenido pueden emplearse diferentes instrumentos, tal es el caso de los exámenes de opción múltiple, ensayos, exámenes orales, observación directa. Los resultados obtenidos deberá emplearlos el tutor para realimentar al estudiante, para que tome conciencia de su ejecución bajo la aceptación de la crítica constructiva.

La evaluación integral e individual de cada sujeto para su progreso y desarrollo es, en otros términos, la evaluación por competencias, puesto que involucra conocimientos (lo cognitivo), habilidades intelectuales y motoras (saber hacer), los valores y actitudes (saber ser). Pensar en un sistema integral de evaluación, involucra a todos los actores esto es directivos, docentes y estudiantes, mediante normas y acuerdos pactados desde el inicio de la rotación, asignatura y/o semestre.

De tal forma que el graduado competente reconoce un problema y es capaz de realizar los pasos necesarios para enfrentarlo, esta aptitud la integra con todas las demás y las emplea en un proceso racional de toma de decisiones.

Criterios para la evaluación integral de competencias cognitivas, procedimentales y actitudinales.

1. Reconoce que existe un problema. Observa y separa los aspectos relevantes e irrelevantes.
2. Examina el problema desde distintos puntos de vista. Tolerancia las preocupaciones y opiniones de otros y conversa con diferentes puntos de vista. Considera un problema como una oportunidad de cambio o avance en el conocimiento.
3. Enuncia el problema en forma clara y objetiva. Organiza los elementos de forma apropiada, se enfoca a los temas de mayor impacto y define la severidad y alcance del problema.
4. Elabora soluciones parciales flexibles. Aplica conocimiento previo a una nueva experiencia, reconoce las limitaciones del conocimiento previo e identifica nueva información requerida para resolver el problema.
5. Recaba e integra información necesaria. Identifica fuentes de información y las utiliza en forma eficiente para obtener la información requerida con la que después de interpretarla e integrarla genera un nuevo conocimiento; evalúa información con respecto a recomendaciones.
6. Formula un plan informado de acción para resolver un problema. Reconoce factores internos y externos que influyen en el plan, identifica barreras potenciales, anticipa la oposición y desarrolla estrategias alternativas y considera los efectos adversos y favorables del plan.
7. Implementa una solución. Comunica, actúa, utiliza un abordaje de equipo cuando es necesario, planea, lleva a cabo un seguimiento y reevalúa a largo plazo.

Ventajas y dificultades

Cuando el aprendizaje basado en problemas se realiza en forma adecuada, el estudiante presenta un sentimiento de logro, que rebasa a la sola memorización de contenidos.

Características positivas del estudiante que promueve el aprendizaje basado en problemas:

- Toma de decisiones metodológica.
- Adquisición del razonamiento del área en estudio.
- Manejo integral de las situaciones.
- Aprendizaje autodirigido y educación continua.
- Capacidad para trabajar en equipo.
- Participaciones relevantes en las discusiones y habilidades de comunicación efectiva.

Dificultades en la aplicación del aprendizaje basado en problemas:

- Los estudiantes pueden sentirse ansiosos ante una educación menos dependiente del profesor y que requiere de aprendices más activos.
- La elaboración y consulta del material (escenarios, casos, simuladores, modelos, programas virtuales, etc.) que se empleara en las sesiones requiere de tiempo y esfuerzo académico.
- La habilidad del profesor para desempeñarse como tutor requiere del desarrollo de talleres para su formación, con lo cual también disminuye la ansiedad de los docentes debido al cambio de funciones que implica esta metodología.

Con respecto a las competencias, los estudios de la Organización Internacional de Trabajo en América Latina evidenciaron en los últimos tres años, que la principal carencia para mejorar la competitividad es la falta de una capacitación adecuada.

En América Latina está presente la necesidad de realizar reformas en las instituciones y modelos de educación para el trabajo, por lo que se han desarrollado sistemas de normalización y certificación de competencias [7].

Tabla 1. Dos versiones de la competencia

	Competencia operacional	Competencia académica
1. Epistemología	Saber cómo	Saber qué
2. Situaciones	Definidas pragmáticamente	Definidas por campo intelectual
3. Foco	Resultados	Proposiciones
4. Transferibilidad	Metaoperaciones	Metacognición
5. Aprendizaje	Experiencial	Proposicional
6. Comunicación	Estratégica	Disciplinaria
7. Evaluación	Económica	De verdad
8. Orientación hacia Valores	De supervivencia económica	De la disciplina
9. Condiciones de límites	Normas organizativas	Normas del campo intelectual
10. Crítica	Para la mejor eficacia práctica	Para la mejor comprensión cognitiva

La educación para formar personas competentes, no se puede realizar desde la imposición o la transmisión oral del conocimiento, debe realizarse atendiendo a la necesidad de promover un aprendizaje responsable y autónomo, con una posición propia, que permita analizar, criticar, indagar y reconstruir el conocimiento para transformar la realidad; a través de planes de estudio flexibles, dinámicos, y abiertos a la sociedad que responda a las necesidades de esta. Por lo cual la Declaración Mundial sobre Educación en el siglo XXI (1998), propuso "una mejor capacitación del personal, la formación basada en competencias, la mejora y conservación de la calidad de la enseñanza y los servicios" y estableció entre otras como funciones y misiones de la educación superior: Artículo 1. Educar y formar para propiciar el aprendizaje permanente, Artículo 7. Reforzar la cooperación con el mundo del trabajo y el análisis y la previsión de las necesidades de la sociedad [7].

Como se puede observar ambas propuestas de educación: el aprendizaje basado en problemas y la educación basada en competencias, presentan apartados en común, tal es el caso de los postulados cognoscitivistas en los que se fundamentan. La actividad de aprendizaje centrada en el alumno, la enseñanza tutorial, el trabajo colaborativo, el apego a programas académicos para la elaboración de material y la selección de situaciones en las que se desempeñará el estudiante, la necesidad de la capacitación del docente y del estudiante para llevar a cabo estas propuestas. Es necesario que los docentes sean los responsables de identificar las áreas académicas en las que pueden implementarse, así como de definir en grupos colegiados el material que deberá emplearse y la forma en la que realizará la evaluación, todo ello en beneficio del logro de mejores aprendizajes que permitan a los estudiantes llevar a cabo desempeños certeros, oportunos y confiables.

Referencias

1. Valle, F. M. A. (2000). Formación por competencias y certificación profesional. Pensamiento Universitario. Tercer época 91. CESU, UNAM, 23-31.
2. Tarazona, J. L. (2005). Revista colombiana de ginecología y obstetricia Vol. 56 No. 2, 147-154.
3. Vidal, L. M. (2003). Educación Médica Superior Vol. 17, 3-6.
4. Moreno, R. I. (2000). La educación basada en normas de competencia como un nuevo modelo de la formación profesional del médico. Pensamiento Universitario 91, tercera época, 45-91.
5. Martínez, G. A. (2006). Aprendizaje basado en problemas en la enseñanza de la medicina y ciencias de la salud. Facultad de Medicina, UNAM, 2-7.
6. Guzmán, J. C. (1999). Modelos curriculares de la educación basada en competencias. Psicología pedagógica II. Facultad de Psicología, UNAM, 11-14.
7. Vargas, Z. F. (2000). La formación basada en competencias en América Latina. CINTERFOR, OIT. <http://www.cinterfor.org.uy/public/spanish/region/ampro/cinterfor/temas/complab/evento/>.

Referencias adicionales:

1. Barnett, R. (2001). Los límites de la competencia. Ed. Gedisa, Barcelona, España.
2. Harden R. M., Crosby J. R. y Davis M. H. (1999). Medical Teacher Vol. 21, No. 1.
3. Organización Panamericana de la Salud (1998). Programa de formación en salud internacional: una propuesta educativa basada en competencias. División de desarrollo de recursos humanos. OPS/OMS, Washington, D.C. <http://www.americas.healths-scetor-reform.org/sidorh/documentos>.
4. Harden R.M., Crosby J.R. Outcome-based education: Part 5. From Competency to meta-competency: a model for the specification of learning outcomes, Centre for Medical Education, AMME Guide No. 14. 2006.
5. Lifshitz, A (2004). La enseñanza de la competencia clínica, Gaceta Médica de México Vol.140 #3, 312.
6. Venturelli J. Desarrollo de una unidad educacional en el contexto del Aprendizaje Basado en Problemas, Univ. Mc Master, Hamilton Ontario Canada. 2006.
7. Smith S. R., Fuller B. K., Dollase R. H. (2000). An educational blueprint for the Brown Medical School. http://www.biomed.browm.edu/Medicine_programs/MD200/Blueprint_for_the_web_04.pdf.

Semblanza la Dra. Norma Lucía Ramírez López



Médica Cirujana egresada de la Facultad de Medicina, UNAM. Interesada en la Educación Médica, inicia en este campo en 1994 y continúa hasta la fecha con el apoyo a los alumnos suspendidos en el examen profesional a través del curso de recuperación académica y titulación de dicha Facultad. Su interés en la formación de los docentes en medicina, la lleva a cursar los diplomados en enseñanza de la medicina y enseñanza estratégica de la medicina, así como la Maestría en comunicación educativa y nuevas tecnologías en el Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa. Con la finalidad de ofrecer herramientas que permitan fortalecer los procesos cognitivos del razonamiento médico imparte cursos a los docentes de Medicina con temáticas diversas, tales como introducción a la formación docente, estrategias de enseñanza-aprendizaje, aprendizaje basado en problemas, planeación estratégica de la enseñanza, las competencias en medicina y evaluación entre otros. Actualmente labora como personal académico en la Secretaría de Educación Médica de la Facultad de Medicina de la UNAM.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LA PROTEÍNA DESACOPLANTE UCP1 DEL TEJIDO ADIPOSO CAFÉ: MECANISMO, ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y REGULACIÓN

Eduardo Rial y María del Mar González-Barroso
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, España
rial@cib.csic.es

Resumen

El tejido adiposo café es un órgano termogénico presente sólo en mamíferos. Su alta capacidad calorífica se debe a un gran contenido en mitocondrias y a la presencia en la membrana interna de éstas de la proteína desacoplante UCP1. La UCP1 es un transportador de protones que permite la disipación controlada del gradiente de protones generado por la cadena respiratoria. La actividad de la proteína está regulada por dos ligandos. Los nucleótidos de purina mantienen la proteína inhibida en condiciones no termogénicas mientras que los ácidos grasos, actuando como segundos mensajeros de la noradrenalina, activan el transporte de protones. El mecanismo molecular de transporte y su regulación son aún controvertidos pero los datos apuntan a que los ácidos grasos actúan como grupo prostético y el carboxilato participa en la ruta de translocación de los protones. De modo más reciente se ha descrito la presencia de proteínas homólogas a la UCP1 no sólo en diferentes tejidos animales sino también en plantas e incluso en hongos. Esta amplia distribución sugiere que el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa podría ser una estrategia adoptada de modo general por los seres vivos para regular la eficiencia energética. Se han descrito toda una serie de procesos en los que las UCPs parecen jugar un importante papel. Sin embargo, el más destacado parece ser el de servir como mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo ya que, al aumentar la actividad respiratoria debido a un incremento en la fuga de protones, disminuiría la producción de especies reactivas del oxígeno.

Palabras clave: Mitocondria, Bioenergética: Transporte, Eficiencia, Proteína Desacoplante

Abstract

Brown adipose tissue is a thermogenic organ only present in mammals. Its remarkable heating capacity is mainly due to the high content of mitochondria and the presence in their inner membrane of the uncoupling protein UCP1. UCP1 is a proton carrier that allows a controlled dissipation of the proton gradient generated by the respiratory chain. The protein's activity is regulated by two ligands. Purine nucleotides maintain the protein inhibited under non-thermogenic conditions. Fatty acids act as second messengers for noradrenaline and activate the proton conductance. The molecular mechanism of transport and its regulation are still controversial but available data point to fatty acids as a prosthetic group with the carboxylate participating in the proton translocation pathway. Recently, a number of proteins homologous to UCP1 have been described not only in many phyla within the animal kingdom but also in plants and fungi. This ubiquitous presence suggests that the uncoupling of the oxidative phosphorylation may be a general strategy adopted by living organisms to adjust the energetic efficiency. UCPs have been shown to play a significant role in a variety of biological processes. However, it appears that the most prominent one would be as part of the defence mechanisms against oxidative stress. An increase in the respiratory activity due to an increased proton leakage would lead to a decrease in the production of reactive oxygen species.

Keywords: Mitochondria, Bioenergetics, Transport, Efficiency, Uncoupling Protein

Fundamentos de bioenergética

La mayoría de los procesos biológicos que necesitan energía la toman de la reacción de hidrólisis del ATP. El ATP es, por tanto, un intermediario clave en el metabolismo y se sintetiza fundamentalmente utilizando la energía que queda disponible de la oxidación de grasas y azúcares en la célula. La serie de reacciones que aseguran su producción en la mitocondria se denominan globalmente fosforilación oxidativa (revisado en [1]) (Fig. 1). Brevemente, durante la respiración mitocondrial, la oxidación de sustratos en la cadena respiratoria conlleva un flujo de electrones desde estos sustratos hasta el oxígeno. La energía disponible tras estos procesos de óxido-reducción es utilizada para bombear protones fuera de la matriz generándose, por tanto, un gradiente de potencial electroquímico de protones. La energía de este gradiente se utilizará principalmente para la producción de ATP en la H⁺-ATPasa mitocondrial pero también para el transporte de iones y metabolitos. En estado estacionario, el bombeo de protones a través de la cadena respiratoria tiene que estar estrechamente compensado por la reentrada de éstos en la matriz. Como la principal vía de reentrada es la ATPasa, la velocidad de respiración está controlada principalmente por la demanda de ATP en la célula. Se puede decir, por tanto, que la velocidad de respiración se ajusta a la demanda que hace la célula para que se sintetice ATP. Este acoplamiento tiene una importante consecuencia para la economía celular: no se malgastan las reservas.

Hay situaciones fisiológicas en las que esta eficiencia energética debe sacrificarse. Un caso paradigmático es la termogénesis inducida por el frío. Cuando un mamífero recién nacido es expuesto al frío, un tejido especializado, el tejido adiposo café, acelera la quema de sustratos y la energía se libera en forma de calor. Para conseguir burlar el acoplamiento de la fosforilación oxidativa, las mitocondrias de los adipocitos café tienen una proteína que permite que los protones vuelvan a la matriz sin que haya síntesis de ATP (Fig. 1). Se acelera, por tanto, la respiración y se disipa la energía del gradiente de protones en forma de calor. Debido a su función, a esta proteína se la ha denominado proteína desacoplante (abreviada UCP, del inglés “*uncoupling protein*”) (revisado en [2]). En la naturaleza existen otros mecanismos termogénicos que no requieren de proteínas desacoplantes. Por una parte, están aquellos procesos disipadores de energía que implican una gran demanda de ATP como la tiritación o los ciclos

fútiles y por otra, mecanismos que permiten modificar la estequiometría del bombeo de protones en la cadena respiratoria para hacerla menos eficiente [3].

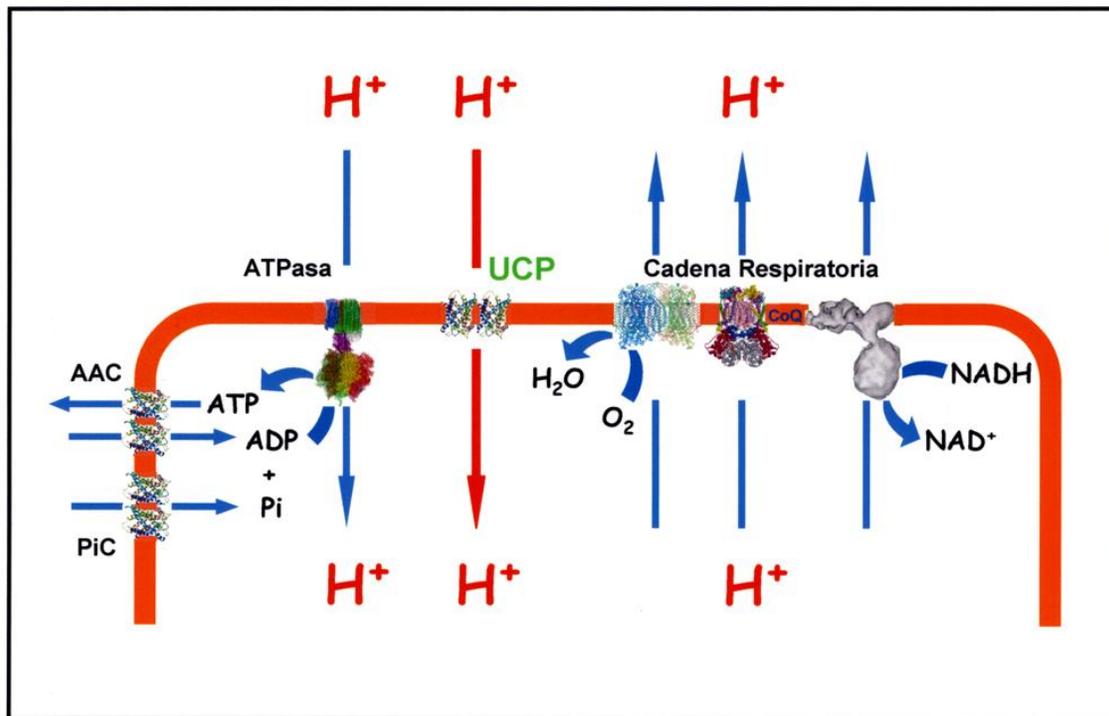


Figura 1. Esquema de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Los sustratos como el NADH son oxidados en la cadena respiratoria y el flujo de electrones desde estos sustratos hasta el oxígeno se encuentra acoplado al bombeo de protones hacia el exterior de la mitocondria. Se genera un gradiente de protones que sirve como reservorio de energía y que se utiliza para generar ATP o para transportar iones y metabolitos. Se muestra la translocasa de adenín nucleótidos (AAC) y el transportador de fosfato (PiC). Las proteínas desacoplantes (UCP) permiten la reentrada de los protones a la matriz, disipando la energía del gradiente en forma de calor.

La familia de las proteínas desacoplantes

El tejido adiposo café es un órgano termogénico y la proteína desacoplante UCP1 la clave de su gran capacidad para producir calor. La proteína responsable de la actividad desacoplante fue identificada en 1978 por Nicholls y colaboradores como una proteína de 32 kDa que se marcaba con [³²P]-azido-ATP desde la cara citosólica y cuya unión podía desplazarse con GDP pero era insensible a atractilato [4]. Dos años antes Ricquier y colaboradores habían descrito que una banda proteica de 32 kDa aumentaba de modo muy notable en mitocondrias de tejido adiposo café de ratas que habían sido expuestas al frío [5]. Estos autores no la relacionaron con el sitio de disipación de energía y supusieron que se trataba de una flavoproteína o de algún tipo de citocromo de función desconocida. Los dos grupos habían identificado la misma proteína con dos aproximaciones diferentes. Durante dos décadas se consideró a la UCP1 como una proteína singular sólo presente en un tejido altamente especializado que es exclusivo de mamíferos.

En 1997, Ricquier y su grupo identificaron una proteína que mostraba un 59% de identidad con la UCP1 y que se denominó UCP2 [6]. En contraste con la UCP1, la UCP2 muestra un patrón de expresión que la hace prácticamente ubicua (tejido adiposo blanco y café, cerebro, músculo, macrófagos, células β-pancreáticas, estómago, intestino, etc.) (Fig. 2). Con

pocos meses de diferencia se describió una nueva proteína homóloga, la UCP3, que presentaba un 54-57% de identidad con UCP1 y 73% con la UCP2 [7]. Esta proteína se expresa casi exclusivamente en músculo esquelético y tejido adiposo café. Otras dos proteínas, UCP4 y BMCP1, fueron descritas poco después aunque evolutivamente se encuentran mucho más distantes. Los programas de secuenciación de genomas han puesto de manifiesto que los genes que codifican proteínas homólogas a la UCP1 tienen una distribución muy amplia, habiéndose encontrado no sólo en todo el reino animal sino también en plantas e incluso en organismos unicelulares (revisado en [8]). Esta amplia presencia sugiere que el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa podría ser una estrategia adoptada de modo general para regular la eficiencia energética. En cualquier caso conviene reseñar que un cierto grado de homología no puede ser traducido en una misma función y que habrá que esperar a que datos bioquímicos determinen si un producto génico determinado es capaz de modular la eficiencia de la fosforilación oxidativa.

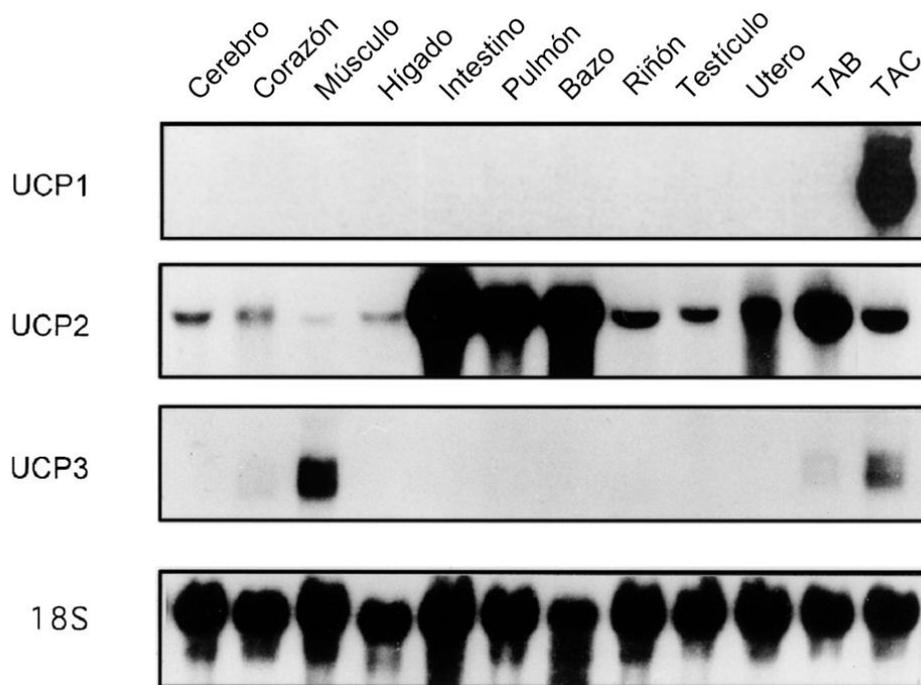


Figura 2. Niveles de ARNm de las proteínas desacoplantes UCP1, UCP2 y UCP3 en diferentes órganos y tejidos de ratón. TAB, tejido adiposo blanco; TAC, tejido adiposo café. Los niveles del ARNr 18S se muestran como control de la carga de muestra en el gel. Adaptado de [9].

Diez años después de su descubrimiento, y a pesar de que se hayan publicado durante este tiempo cerca de un millar de artículos, la función biológica de las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3 sigue siendo extraordinariamente controvertida (revisado en [10]). Desde su descubrimiento, a las nuevas UCPs se las ha relacionado con funciones biológicas tan distintas como la termogénesis, la eliminación de un exceso de calorías o el mantenimiento del balance redox. Sin embargo, la idea que está tomando más fuerza implica a la UCP2, y posiblemente a la UCP3, en el control de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), constituyendo un mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo (revisado en [11]). La aceleración de la respiración debido al desacoplamiento inducido por una UCP llevaría a una reducción de la producción de ROS por la cadena respiratoria. De hecho, el primer fenotipo que se describió en el ratón *knock-out* para la UCP2 fue, curiosamente, unos mayores niveles de ROS en los macrófagos, lo cual confirió a estos ratones una mayor resistencia a la infección por toxoplasma.

En este mismo sentido, se ha descrito que la UCP2 protege frente al estrés oxidativo tras la isquemia. Se ha observado un efecto activador directo del radical superóxido sobre la actividad translocadora de protones, no sólo de la UCP2 sino también de la UCP1 y UCP3, por lo que se ha propuesto que esta es la base molecular del mecanismo protector y que, por tanto, se pondría en marcha cuando hay un aumento de niveles de ROS (revisado en [11,12]). Por ejemplo, en células tumorales aumenta la expresión de UCP2 como mecanismo de defensa frente a agentes anti-cancerosos que actúan provocando estrés oxidativo [13]. Del mismo modo, ciertas patologías que implican disfunciones de la célula β -pancreática (hiperglicemia, hiperlipidemia, etc.) causan un aumento de niveles de ROS y como respuesta aumenta la expresión de UCP2 (revisado en [11]).

Existe otra propuesta para el papel de la UCP2 y UCP3 derivada de la observación del aumento de la expresión de estas proteínas en músculo cuando se están utilizando ácidos grasos como fuente de energía. Este aumento se produce incluso cuando se han movilizado los ácidos grasos como consecuencia de una situación de ayuno y, por tanto, no debería tener una función disipadora de energía. La propuesta es que estas proteínas desacoplantes son transportadores de ácidos grasos o, incluso, de productos de su peroxidación. Según esta hipótesis, los ácidos grasos libres se acumularían en la mitocondria debido a su capacidad de cruzar protonados la membrana interna. Para evitar su acumulación en la matriz, las UCPs catalizarían su salida de la mitocondria. Esta propuesta deriva del ciclo protonofórico propuesto por Skulachev para explicar la participación de determinados transportadores mitocondriales en el desacoplamiento causado por los ácidos grasos de cadena larga [14] (ver más adelante).

Las proteínas desacoplantes forman parte de una superfamilia de proteínas que incluye a todos los transportadores de metabolitos de la membrana interna mitocondrial ("*solute carrier family 25*" o SLC25) (revisado en [15]). La característica más notable de esta familia es que todos sus miembros tienen una secuencia de unos 100 aminoácidos que se repite tres veces. Cada dominio a su vez, contiene dos regiones hidrofóbicas transmembranales unidas por una larga región hidrofílica (Fig. 3). La conexión entre los tres dominios tiene lugar mediante otra pequeña región hidrofílica. El análisis de la secuencia de estos transportadores ha revelado la presencia de dos motivos conservados que se encuentran en los dos extremos de la larga asa hidrofílica. El primero, P-x-(D/E)-x₂-(R/K), está en el extremo C-terminal de la primera hélice de cada repetición mientras que el segundo, (E/D)-G-x₄-(aromático)-(K/R)-G, está en el extremo C-terminal del asa. Estas dos secuencias se han utilizado para definir un perfil denominado *Solcar* (número de acceso PROSITE PS50920) que se utiliza para identificar nuevos miembros de esta familia de proteínas. La gran homología existente entre los dominios y a su vez entre todos estos transportadores, hace pensar que esta familia se originó tras la triplicación de una secuencia ancestral común y a partir de la cual han surgido los distintos transportadores mitocondriales (revisado en [16]). Los extremos carboxi- y amino-terminal se encuentran en el lado citosólico de la membrana interna por lo que las largas asas de conexión entre los tres dominios se encuentran en el lado de la matriz. La resolución de la estructura tridimensional de la AAC ha confirmado la topología de esta familia de proteínas que se había postulado con base en los análisis de secuencia [17].

Regulación fisiológica de la actividad de la UCP1

La baja eficiencia energética de las mitocondrias de tejido adiposo café se conocía desde los años sesenta y enseguida se le relacionó con el papel termogénico del tejido (revisado en [18,19]). En un principio se pensó que esta disminución en el rendimiento energético podía ser consecuencia de la pérdida de la maquinaria del proceso de fosforilación oxidativa. Sin embargo, esta posibilidad se descartó cuando se demostró que el control respiratorio volvía a valores comparables a otras mitocondrias cuando al medio de incubación se añadían nucleótidos de purina (ATP o GDP) y se eliminaban los ácidos grasos endógenos (revisado en [19]). *In vivo*, el ATP citosólico se une a la UCP1 desde la cara matricial de la proteína y su función fisiológica

es, por tanto, mantener la proteína inhibida en condiciones no termogénicas.

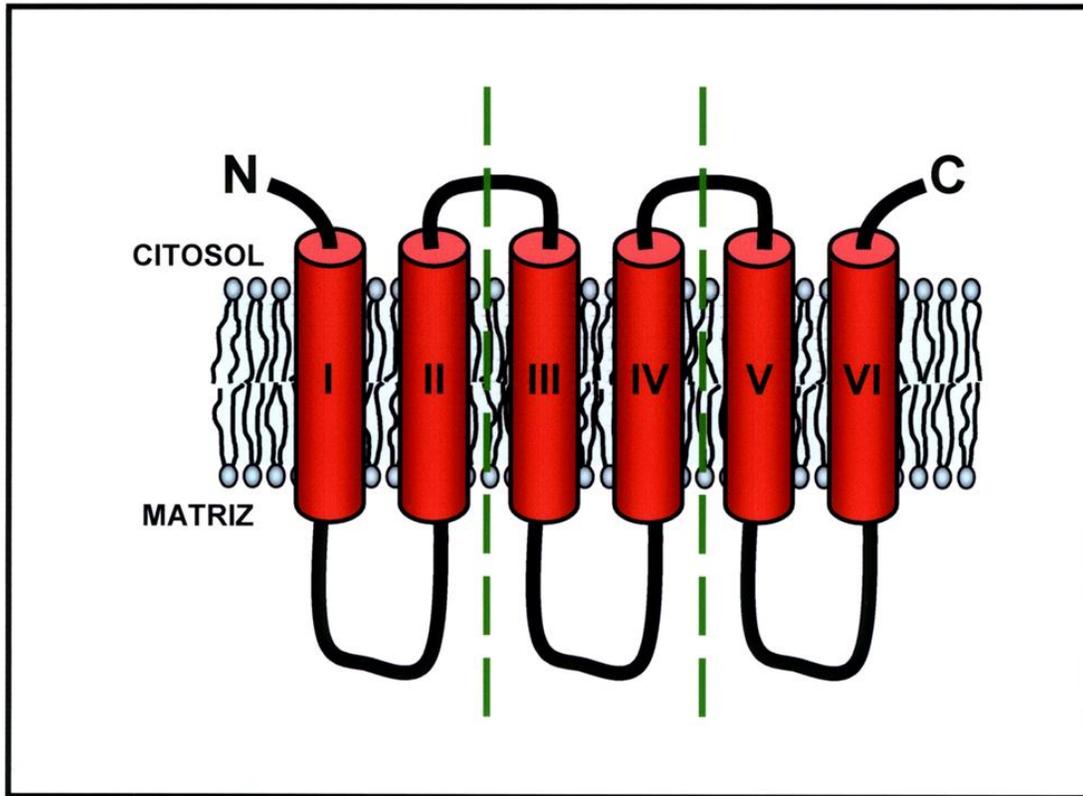


Figura 3. Estructura tripartita de los miembros de la familia de transportadores de metabolitos de la membrana interna mitocondrial. Cada dominio tiene dos regiones transmembranales unidas por un largo dominio hidrofílico expuesto a la matriz mitocondrial.

La capacidad de los ácidos grasos para desacoplar la fosforilación oxidativa en todo tipo de mitocondrias es una propiedad bien conocida y fue descrita por primera vez por Pressman y Lardy en 1952 [20]. Pronto quedó claro que a altas concentraciones los ácidos grasos actuaban a modo de detergente sobre cualquier tipo de mitocondrias pero, por otra parte, también se observó que bajas concentraciones ejercían una función protonófora equivalente a la producida por otros desacoplantes típicos (revisado en [21]). Esta acción protonófora requería un movimiento de translocación de la forma protonada de los ácidos grasos desde la cara citosólica de la membrana mitocondrial interna hasta la cara matricial (*flip-flop*). Aquí liberaría un protón, y posteriormente la forma aniónica tendría que regresar a la cara citosólica. En 1988, Skulachev y colaboradores descubrieron que el carboxiatractilato podía inhibir parcialmente el desacoplamiento inducido por los ácidos grasos en mitocondrias de hígado [22]. Esto hizo que se implicase a la translocasa de adenín nucleótidos (AAC) en el mecanismo del desacoplamiento, y propusieron que el retorno de la forma aniónica de los ácidos grasos hacia la cara citosólica de la membrana interna era facilitado por el propio transportador. Este comportamiento se comprobó en liposomas con AAC reconstituido y en otros transportadores mitocondriales como el de aspartato/glutamato (AGC), dicarboxilato (DIC), fosfato (PIC) o las propias UCPs (revisado en [23]).

El hecho de que los ácidos grasos fueran desacoplantes inespecíficos de todo tipo de mitocondrias hacía poco atractiva la hipótesis de que fueran los reguladores fisiológicos de la UCP1. Esto a pesar de que se había observado que las mitocondrias de tejido adiposo café eran desacopladas con concentraciones mucho más bajas que las del resto de tejidos (revisado en

[23]). El papel regulador se pudo establecer en los años ochenta cuando se diseñaron experimentos en los que se reproducía la transición al estado termogénico en células y mitocondrias aisladas simulando la lipólisis que induce la noradrenalina. Para ello, se añadía lentamente palmitato a una incubación de mitocondrias en las que había ATP, CoA y carnitina mientras se monitorizaba el consumo de oxígeno y las variaciones en el potencial de membrana. Estos experimentos demostraron que la conductancia a los protones se relacionaba de modo preciso con la concentración de palmitato libre y cuando éste era metabolizado, y desaparecía del medio de incubación, el potencial de membrana se recuperaba y se restablecía el control respiratorio. Se demostró, además, que la sensibilidad de las mitocondrias al palmitato dependía de la presencia de la UCP1 ya que mitocondrias aisladas de tejido adiposo café de animales que no habían sido expuestos al frío (sin UCP1) se comportaban como las mitocondrias de hígado (revisado en [19]). Con posterioridad se han confirmado estas observaciones tanto en levaduras que expresan UCP1 de modo recombinante [24] como en ratones *knock-out* para la UCP1 [25]. En ambos sistemas, la presencia de la UCP1 confiere una alta sensibilidad a los ácidos grasos.

La regulación fisiológica de la termogénesis en el tejido adiposo café está, por tanto, bien establecida a nivel celular (Fig. 4). El hipotálamo envía la señal de inicio de la termogénesis a través del sistema nervioso simpático. La noradrenalina, liberada por las numerosas fibras simpáticas que inervan el tejido adiposo café, se une a los receptores β 3-adrenérgicos de los adipocitos activando la adenilato ciclasa y causando un aumento de los niveles citoplásmicos de cAMP. Este aumento de cAMP desencadena una cascada lipolítica al activarse una lipasa sensible a hormonas que moviliza las reservas de triglicéridos. Los ácidos grasos liberados van a jugar un doble papel. Por un lado van a ser el sustrato que será oxidado en las mitocondrias pero, además, actúan sobre la UCP1 activando el transporte de protones y, por tanto, la disipación del gradiente de protones en forma de calor. Los ácidos grasos ejercen, por consiguiente, el papel de segundos mensajeros de la noradrenalina (revisado en [2,19]).

Mecanismo molecular de transporte de la UCP1

Aunque el papel de los ácidos grasos como reguladores fisiológicos de la UCP1 está bien aceptado, el mecanismo molecular de su acción sigue siendo controvertido. El eje de las discrepancias se encuentra en la especie que es transportada por la UCP1. Mientras que un grupo de autores defienden que la UCP1 es un transportador de protones, otros grupos defienden que la UCP1 es un transportador de aniones y los ácidos grasos son uno de los sustratos que pueden transportar.

Los sustratos que transportan la mayoría de los miembros de la familia mitocondrial de transportadores de metabolitos son aniónicos. Los primeros estudios de bioenergética llevados a cabo con la UCP1 demostraron que las mitocondrias de tejido adiposo café presentaban una alta permeabilidad a aniones que pronto se relacionó con la presencia de la UCP1 [26]. La competencia observada entre el transporte del anión cloruro y los protones indicaba que existía una vía común para el transporte de protones y aniones. Esta observación llevó a la propuesta de que durante el proceso de disipación del gradiente de potencial electroquímico, la UCP transportaba el anión hidroxilo, lo cual experimentalmente es indistinguible de un uniporte de protones [27]. Posteriormente otros autores describieron que la UCP1 podía transportar muchos otros aniones entre los que cabría destacar sulfonatos y alquilsulfatos [28]. La velocidad de transporte y su afinidad aumentaban con la hidrofobicidad del sustrato. A raíz del antes mencionado descubrimiento de que el carboxiatractilato inhibía parcialmente el desacoplamiento originado por el palmitato en mitocondrias de hígado [22], se propuso una hipótesis según la cual, en condiciones fisiológicas, la UCP1 es exclusivamente un transportador de ácidos grasos [29]. Según este modelo, los ácidos grasos son transportados por la UCP1 hacia el lado citosólico de la membrana interna en su forma aniónica de modo semejante al que ocurre en otros transportadores mitocondriales, es decir, de modo electroforético. La translocación de los protones a la matriz ocurriría a través de la bicapa lipídica mediante un movimiento de *flip-flop*. El

ácido graso captaría el protón en el lado citosólico y lo liberaría en el lado de la matriz completándose así un ciclo cuyo resultado neto sería la translocación de un protón en la matriz. En este modelo, en ausencia de ácidos grasos no hay transporte.

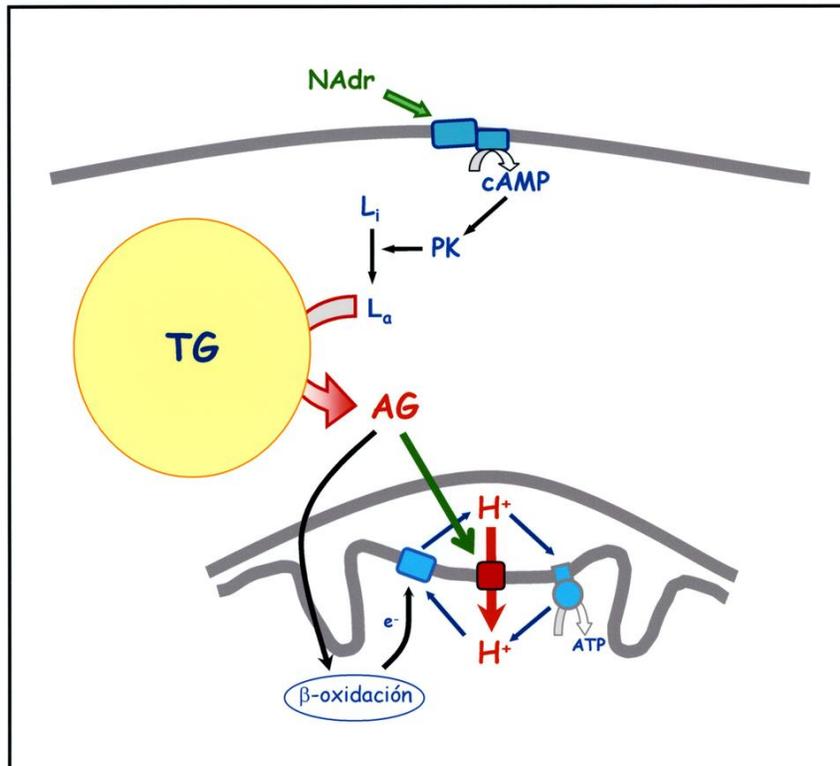


Figura 4. Regulación de la termogénesis en el tejido adiposo café. La noradrenalina (NAdr) liberada por las terminales nerviosas simpáticas se une a un receptor β -adrenérgico y desencadena una cascada lipolítica en las que se movilizan las reservas de triglicéridos (TG). Los ácidos grasos liberados (AG) son oxidados en la mitocondria. Los ácidos grasos activan la UCP1 aumentando su conductancia a los protones. Este desacoplamiento de la fosforilación oxidativa hace que se acelere la respiración y que la energía del gradiente de protones se libere en forma de calor.

Existe una hipótesis alternativa que postula que la UCP1 es un transportador de protones y los ácidos grasos actúan como grupo prostético facilitando la translocación [30,31]. En este modelo el grupo carboxilato del ácido graso participa en la ruta de translocación de los protones. Es importante señalar que para el estudio del mecanismo de transporte y regulación de la UCP1 hay que diferenciar entre las propiedades de la proteína en ausencia y en presencia de nucleótidos. Es conocido desde los años sesenta que en ausencia de nucleótido, la UCP1 facilita el paso de una gran variedad de sustratos de naturaleza aniónica [26,28]. Esta situación no es fisiológica ya que, *in vivo*, la concentración citosólica de ATP es lo suficientemente alta como para mantener saturado el centro de unión. Cabe resaltar que una caída en los niveles de ATP citosólico, con el consiguiente incremento en los niveles de ADP, no alteraría de modo significativo la actividad de la UCP1 ya que el ADP es también un ligando inhibitorio de la proteína [32]. Aunque la actividad de la UCP1 en ausencia de nucleótidos no es de relevancia fisiológica, la información que aporta es importante para discriminar entre distintos mecanismos de transporte.

Los primeros experimentos de bioenergética realizados con mitocondrias de tejido

adiposo café establecían de modo inequívoco que, para obtener mitocondrias acopladas, no sólo era necesario retirar los ácidos grasos de las preparaciones sino que, además, era necesaria la presencia de nucleótidos [33]. La actividad transportadora de la UCP1 en ausencia de los dos ligandos reguladores, nucleótidos y ácidos grasos, es una cuestión crucial debido a sus profundas implicaciones en el mecanismo molecular de transporte. Si el desacoplamiento observado en las mitocondrias del tejido adiposo café necesitara de la translocación de ácidos grasos a través de la UCP1, en su ausencia, no deberíamos observar desacoplamiento. Si por el contrario, la UCP1 es un transportador de protones y los ácidos grasos son sólo un regulador, se podría ver actividad en su ausencia.

El aislamiento de mitocondrias de tejido adiposo café presenta una complicación adicional para analizar esta cuestión debido a las reservas de triglicéridos de los adipocitos. Garlid y colaboradores señalaron que la actividad que se observa en ausencia de ácidos grasos no es tal ya que durante la homogenización del tejido, y salvo que se empleen altas concentraciones de albúmina, los ácidos grasos se unen a las membranas mitocondriales y no es posible retirarlos [34]. Para evitar este problema se han utilizado mitocondrias de levaduras que expresan UCP1 aisladas en presencia de albúmina y de un inhibidor de la actividad fosfolipasa mitocondrial. En estas condiciones se detecta una actividad basal inhibible por nucleótidos en ausencia de ácidos grasos y que no está presente en mitocondrias control [24]. Además, se han reexaminado los experimentos hechos con mitocondrias de tejido adiposo café utilizando durante la homogenización concentraciones de albúmina de hasta 50 mg/ml y tomando precauciones adicionales para minimizar la presencia de ácidos grasos endógenos. En esas condiciones, y en ausencia de nucleótidos, las mitocondrias de tejido adiposo café muestran una tasa de respiración muy similar a la que se observa en presencia del desacoplante FCCP [23]. Estos experimentos revelan un aspecto crítico sobre la actividad de la UCP1 que debe ser entendido completamente. Es posible que, incluso después de un aislamiento en presencia de elevadas concentraciones de albúmina, no hubiera sido posible eliminar las últimas trazas de ácidos grasos. Sin embargo, la pregunta que hay que responder es por qué la velocidad de respiración es máxima. Existen dos posibles respuestas:

(1) que esos ácidos grasos residuales representen una concentración saturante y esto haga que la UCP1 refleje una actividad máxima. De ser este el caso, surgirían dos nuevos interrogantes: ¿cuál es la K_m de los ácidos grasos y por qué estos ácidos grasos no se equilibran con la albúmina?. La respuesta podría ser que la afinidad ácido graso-UCP1 es tan alta que los ácidos grasos permanecen “secuestrados” por la UCP1 y no se equilibran con la fase lipídica de la membrana. Esta explicación haría difícil entender la regulación fisiológica de la termogénesis en la que los ácidos grasos juegan el papel de segundos mensajeros de la noradrenalina ya que no sería posible revertir la activación. Como se ha dicho anteriormente, la activación de la UCP1 es reversible. Además, esta unión estable no sería compatible tampoco con la hipótesis que se basa en un ciclaje de los ácidos grasos, ya que se precisa un equilibrio entre el ácido graso y la membrana para que se pueda producir el *flip-flop*. En cualquier caso, esta K_m tan extremadamente baja no corresponde con los valores experimentales obtenidos [35].

(2) que en ausencia de nucleótidos la UCP1 tenga una elevada conductancia a protones que sea independiente de la presencia de ácidos grasos. Esta posibilidad es la que se barajó tras los primeros experimentos de bioenergética con mitocondrias de tejido adiposo café (revisado en [19,23]).

La existencia de una elevada conductancia a protones en ausencia de nucleótidos y ácidos grasos parece indicar que la UCP1 es un transportador de protones. Hay, además, otras evidencias que permiten descartar el modelo basado en un ciclo protonofórico en el que los ácidos grasos sean los sustratos de la UCP1. Como se dijo anteriormente, los alquilsulfonatos pueden ser transportados por la UCP1 al igual que otros aniones. El undecanosulfonato presenta un cierto parecido a los ácidos grasos, pero al ser el pKa del grupo sulfónico mucho menor que el del grupo carboxilo, no se protona a pH fisiológico y, por tanto, son incapaces de hacer *flip-flop*

[29]. Este sería un paso necesario para que el undecanosulfonato pudiera completar el ciclo protonofórico y provocar, por tanto, el desacoplamiento de la respiración. Sin embargo, experimentos hechos con mitocondrias de tejido adiposo café han demostrado que el undecanosulfonato aumenta la conductancia a protones siendo inhibible por GDP, aunque las concentraciones de undecanosulfonato que se precisan para obtener el efecto son casi un orden de magnitud más alta que con palmitato [23]. Como el undecanosulfonato no puede hacer *flip-flop*, la hipótesis basada en el ciclaje de los ácidos grasos no puede ser la base del mecanismo de activación de la UCP1 y los datos disponibles parecen apuntar a que actúan como grupo prostético que activa el paso de los protones. En este modelo el grupo carboxilo del ácido graso participa en la ruta de translocación jugando un papel que recordaría, en cierta medida, al del retinal en la bacteriorodopsina (revisado en [36]).

Se han identificado una serie de residuos que podrían estar implicados en el transporte de los protones. Así, la sustitución del aspártico 27 (Asp27Asn) o del aspártico 210 (Asp210Asn) reduce de modo drástico el transporte de protones sin afectar al de aniones, habiéndose propuesto que el aspártico 210 media en la captación de los protones desde el lado citosólico, mientras que el 27 participaría en la ruta de translocación en el interior de la proteína [37]. También se ha propuesto la participación del par de histidinas 145-147 en el transporte de protones aunque esto ha sido motivo de controversia [38]. Su ausencia en la UCP2 y el hecho de que en la UCP3 sólo se encuentre la His145 llevó incluso a que se planteara que estas nuevas UCPs no transportaban protones. Sin embargo, otros autores generaron el doble mutante His145Asn/His147Asn y no observaron ningún efecto [39]. Nuestro grupo ha reexaminado recientemente el papel del par de histidinas generando una proteína quimera en la que la región del asa citosólica que contiene estos residuos se ha reemplazado por la región homóloga de la UCP2, observándose de nuevo unas propiedades bioenergéticas iguales que en la proteína original [40]. En este trabajo se realizó un análisis filogenético de las UCPs con el fin de identificar los residuos que evolutivamente son característicos de la UCP1 (sinapomorfías), llevándose a cabo un extenso programa de mutagénesis para identificar aquellos que son claves para la actividad. Se identificó al glutámico 134 como esencial para la conductancia basal a los protones, es decir, la que se observa en ausencia de nucleótidos y ácidos grasos. Sin embargo, este residuo no es esencial para el transporte de protones en presencia de ácidos grasos por lo que apunta a que en presencia de nucleótidos, los ácidos grasos inducen una ruta alternativa para los protones (Fig. 5) [40].

El sitio de unión de los nucleótidos

Las UCPs y el AAC interaccionan en condiciones fisiológicas con nucleótidos aunque lo hacen de un modo diferente al resto de proteínas que unen nucleótidos: en ambas el ión Mg^{2+} no participa en la unión ya que durante su ciclo catalítico no se da la hidrólisis/formación de enlaces fosfato-fosfato. No sorprende, por tanto, que no presenten ninguno de los dominios consenso característicos de los enzimas que hidrolizan/sintetizan ATP (revisado en [41]). Sin embargo, ambos transportadores son funcionalmente muy diferentes. Desde el punto de vista de la unión, en la UCP1 los nucleótidos interaccionan con la proteína desde el lado citosólico y únicamente lo hacen para inhibir el transporte, mientras que en el AAC la interacción se da a ambos lados de la membrana y los nucleótidos constituyen el sustrato que se transporta. Esto implica importantes diferencias en cuanto a la afinidad y especificidad. Mientras que el AAC presenta una mayor especificidad con una menor afinidad aparente, la UCP1 se muestra más afín y menos específica. Esto se debe a que en el AAC el nucleótido debe ser translocado por lo que su unión a la proteína implica importantes cambios conformacionales que hacen variar la constante de afinidad que se observa. Además, la mayor especificidad observada en el AAC implica una interacción proteína- nucleótido mucho más estrecha ya que es esta energía de unión la que conduce la translocación de los nucleótidos. La unión provoca un cambio en la conformación del sitio de unión a un estado de baja afinidad que facilita la liberación del nucleótido. La aparente mayor afinidad y menor especificidad de la UCP1 debe ser consecuencia de que el nucleótido es

un inhibidor y que su unión no ocasiona cambios conformacionales drásticos, sino un ligero reordenamiento de la proteína (revisado en [42]). La unión del nucleótido a la UCP1 es lenta y se produce a través de dos estados. En el primer estado la interacción es débil y no provoca inhibición. Un cambio conformacional posterior llevaría al segundo estado en el que la unión es fuerte y correlaciona con la inhibición del transporte (revisado en [42]).

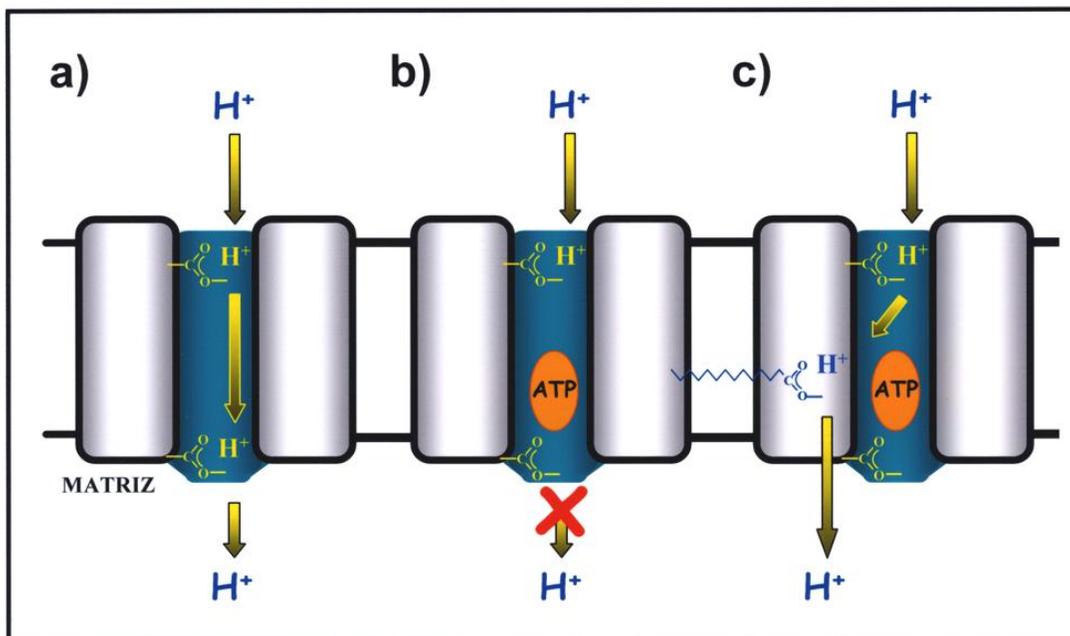


Figura 5. Esquema de la regulación de la actividad transportadora de protones de la UCP1. a) En ausencia de nucleótidos y ácidos grasos la proteína presenta una alta conductancia a los protones. b) El nucleótido accede a su sitio de unión desde la cara citosólica de la proteína e inhibe el transporte de protones. c) Los ácidos grasos actúan como segundos mensajeros de la noradrenalina y aumentan la conductancia a los protones eludiendo la inhibición impuesta por el nucleótido.

La localización del sitio de unión de los nucleótidos no es posible definirla aún con precisión. Los datos de marcaje de fotoafinidad fueron los primeros que aportaron información al demostrar que el nucleótido interacciona con residuos del interior del barril de hélices, en la región hidrofílica que conecta la quinta y sexta hélices transmembranales [43]. Estos resultados y el análisis de los datos disponibles de mutagénesis, espectroscópicos y modificaciones químicas nos permitieron proponer un modelo estructural para el sitio de unión del nucleótido en la UCP1 [41]. En este modelo, el ligando penetra en el barril de hélices α por el lado citosólico llegando hasta la zona más profunda de la proteína e interaccionando con las tres asas matriciales. Las asas formarían un bolsillo hidrofóbico en el que se alojaría el anillo de purina mientras que la cadena polifosfato estaría orientada hacia el centro del barril de modo que las cargas negativas interaccionarían con los residuos de arginina 83, 182 y 276 que se encuentran en los segmentos transmembrana II, IV y VI.

El sitio de unión de los ácidos grasos

La identificación del sitio de unión del ligando activador se ha visto complicada por los pocos requerimientos estructurales de los activadores de la UCP1: cualquier compuesto aniónico monovalente con una hidrofobicidad suficiente que le permita una cierta solubilidad en medio lipídico puede activar la UCP1 (revisado en [31]). La necesidad del carboxilo libre, o la presencia

de otro grupo protonable, se interpreta como reflejo de una implicación directa de éste en el mecanismo de transporte de protones. En general, se tolera la presencia de grupos voluminosos a lo largo de la molécula pero no ocurre lo mismo si éstos se encuentran al final de la cadena. Así, el ácido 4-heptil-benzoico es activo mientras que el 6-fenil-hexanoico no lo es. Sin embargo, el patrón no es tan sencillo ya que tanto el ácido todo-*trans* retinoico como una larga serie de retinoides son potentes activadores de la UCP1 a pesar de que poseen grupos voluminosos alejados del grupo carboxilo [44]. Hay que reseñar, que el ácido todo-*trans* retinoico y el retinoide TTNPB muestran una afinidad por la UCP1 mucho mayor que la del palmitato [45]. En cuanto a la presencia de grupos hidrofílicos en la estructura del activador, existe una cierta tolerancia siempre que se mantenga la solubilidad en el medio lipídico. Es curioso, sin embargo, que la sustitución del propenilo central del TTNPB por un grupo amida en el retinoide AM580 lleva a una pérdida total de la capacidad de activación. Posiblemente la rigidez de estos retinoides impide que, en este caso, el grupo polar introducido pueda ser acomodado en el sitio de unión. El descubrimiento de la ubiquinona como un cofactor esencial para la activación de la UCP1 [46] así como la observación de su capacidad facilitadora de la unión del ácido retinoico a la proteína [47] son argumentos que apoyarían la idea de que el acceso al sitio de unión debe ocurrir por difusión lateral desde la fase lipídica de la membrana interna mitocondrial. Nosotros hemos postulado que este sitio podría estar en la interfaz entre dos hélices transmembranales [44] y que, como los retinoides son moléculas alargadas con poca flexibilidad, el bolsillo hidrofóbico debe ser de al menos 15 Å.

Consideraciones finales

La fisiología del tejido adiposo café y su papel en la termogénesis sin tiritación ha sido objeto de estudio durante las últimas cuatro décadas. El papel central de la proteína desacoplante UCP1 es conocido desde los años setenta y a pesar de haber sido objeto de intenso estudio y debate durante tres décadas existen aún puntos esenciales sobre su mecanismo de transporte y regulación sobre los que no hay consenso. Al igual que ocurre con muchas otras proteínas transportadoras, estos estudios se encuentran limitados por las dificultades de obtener datos estructurales a alta resolución. En las bases de datos del “*Protein Data Bank*” (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) se encuentran en la actualidad la estructura tridimensional de alrededor de 45000 proteínas de las cuales menos de 200 corresponden a proteínas de membrana. En el año 2003 se publicó la única estructura disponible hasta la fecha de un miembro de la familia de transportadores mitocondriales, la estructura de la translocasa de adenín nucleótidos (AAC) en la conformación que adquiere cuando está unida al inhibidor carboxiatractilato [17]. Esta estructura ha ayudado en gran medida a entender la organización espacial de todos los miembros de la familia pero no resuelve las cuestiones centrales sobre el mecanismo de catálisis y las reorganizaciones inherentes al proceso de translocación. El modelado de la estructura de otros miembros de esta familia utilizando la estructura de la AAC no ha aportado de momento respuestas a las preguntas fundamentales.

En la última década ha aparecido un número creciente de proteínas que presentan una gran homología con la UCP1. Estas proteínas han sido denominadas “proteínas desacoplantes” a pesar de que su función fisiológica aún está por dilucidar. Los datos bioquímicos sobre la actividad de estas proteínas son mucho más controvertidos que los de la UCP1 ya que ni siquiera existe consenso sobre si actúan como reguladores de la eficiencia energética de la fosforilación oxidativa. Un trabajo reciente ha presentado evidencias de que tanto la UCP2 como la UCP3 podrían estar implicadas en el transporte de calcio a la mitocondria [48]. Esta publicación va a generar de nuevo controversia en un campo que ha despertado un enorme interés debido a la asociación de estas proteínas con un número creciente de patologías [11].

Agradecimientos

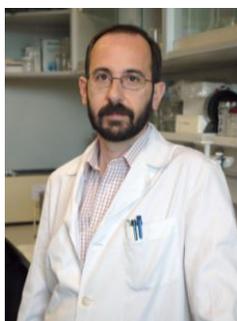
El trabajo de investigación desarrollado por nuestro grupo se encuentra financiado por el Plan Nacional de I+D del Ministerio de Educación y Ciencia español (BFU2006-08182).

Referencias

1. Nicholls, D.G., y Ferguson, S.J. (2002) *Bioenergetics 3*, Academic Press, Londres
2. Nicholls, D.G., y Locke, R.M. (1984) *Physiol. Rev.* **64**, 1-64
3. Silva, J.E. (2006) *Physiol Rev.* **86**, 435-464
4. Heaton, G.M., Wagenvoort, R.J., Kemp, A., y Nicholls, D. G. (1978) *Eur. J. Biochem.* **82**, 515-521
5. Ricquier, D., y Kader, J.C. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 577-583
6. Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D., y Warden, C.H. (1997) *Nature Genet.* **15**, 269-272
7. Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., y Giacobino, J.P. (1997) *FEBS Lett.* **408**, 39-42
8. Ledesma, A., García de Lacoba, M., y Rial, E. (2002) *Genome Biol.* **3**, 3015.1-3015.9
9. Ricquier, D., y Bouillaud, F. (2000) *Biochem. J.* **345**, 161-179
10. Nedergaard, J., Ricquier, D., y Kozak, L.P. (2005) *EMBO Rep.* **6**, 917-921
11. Krauss, S., Zhang, C.Y., y Lowell, B.B. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 248-261
12. Esteves, T.C., y Brand, M.D. (2005) *Biochim Biophys Acta.* **1709**, 35-44
13. Harper, M.E., Antoniou, A., Villalobos-Menuy, E., Russo, A., Trauger, R., Vendemelio, M., George, A., Bartholomew, R., Carlo, D., Shaikh, A., Kupperman, J., Newell, E.W., Bespalov, I.A., Wallace, S.S., Liu, Y., Rogers, J.R., Gibbs, G.L., Leahy, J.L., Camley, R.E., Melamede, R., y Newell, M.K. (2002) *FASEB J.* **16**, 1550-1557
14. Goglia, F., y Skulachev, V.P. (2003) *FASEB J.* **17**, 1585-91
15. Palmieri, F. (2004) *Pflugers Arch.* **447**, 689-709
16. Saier, M.H., Jr. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 5029-5035
17. Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G.J.M., y Brandolin, G. (2003) *Nature* **426**, 39-44
18. Smith, R.E., y Horwitz, B.A. (1969) *Physiol. Rev.* **49**, 330-425
19. Rial, E., y González-Barroso, M.M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 70-81
20. Pressman, B.C., y Lardy, H.A. (1952) *J. Biol. Chem.* **197**, 547-556
21. Wojtczak, L., y Schönfeld, P. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 41-57
22. Andreyev, A.Yu., Bondareva, T.O., Dedukhova, V.I., Mokhova, E.N., Skulachev, V.P., y Volkov, N.I. (1988) *FEBS Lett.* **226**, 265-269
23. Rial, E., Aguirregoitia, E., Jiménez-Jiménez, J., y Ledesma, A. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1608**, 122-130
24. Gonzalez-Barroso, M. M., Fleury, C., Bouillaud, F., Nicholls, D. G., y Rial, E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 15528-15532
25. Matthias, A., Ohlson, K. E. B., Fredriksson, J. M., Jacobsson, A., Nedergaard, J., y Cannon, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 25073-25081
26. Nicholls, D.G., y Lindberg, O. (1973) *Eur. J. Biochem.* **37**, 523-530
27. Nicholls, D.G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **549**, 1-29
28. Jezek, P., y Garlid, K.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19303-19311
29. Garlid, K.D., Orosz, D.E., Modriansky, M., Vassanelli, M., y Jezek, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2615-2620
30. Rial, E., Poustie, A., y Nicholls, D.G. (1983) *Eur. J. Biochem.* **173**, 197-203
31. Klingenberg, M., y Huang, S.G. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1415**, 271-296
32. Nicholls, D.G. (1976) *Eur. J. Biochem.* **62**, 223-228
33. Rafael, J., Ludolph, H.-J., y Hohorst, H.-J. (1969) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 1121-1131
34. Garlid, K.D., Jaburek, M., y Jezek, P. (1998) *FEBS Lett.* **438**, 10-14
35. Cunningham, S.A., Wiesinger, H., y Nicholls, D.G. (1986) *Eur J Biochem.* **157**, 415-420
36. Lanyi, J.K. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1012-1018
37. Echtay, K.S., Winkler, E., Bienengraeber, M., y Klingenberg, M. (2000) *Biochemistry* **39**, 3311-3317
38. Bienengraeber, M., Echtay, K.S., y Klingenberg, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 3-8
39. Hagen, T., y Lowell, B.B. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 642-648
40. Jimenez-Jimenez, J., Zardoya, R., Ledesma, A., Garcia de Lacoba, M., Zaragoza, P., Gonzalez-

- Barroso, M.M., y Rial, E. (2006) *J. Mol. Biol.* **359**, 1010-1022
41. Ledesma, A., García de Lacoba, M., Arechaga, I., y Rial, E. (2002) *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 473-486
42. Klingenberg, M., y Echtay, K.S. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 128-143
43. Winkler, E., y Klingenberg, M. (1992) *Eur. J. Biochem.* **203**, 295-304
44. Tomás, P., Jiménez-Jiménez, J., Zaragoza, P., Vuligonda, V., Chandraratna, R.A.S., y Rial, E. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1658**, 157-164
45. Rial, E., González-Barroso, M.M., Fleury, C., Iturrizaga, S., Sanchis, D., Jiménez-Jiménez, J., Ricquier, D., Goubern, M., y Bouillaud, F. (1999) *EMBO J.* **18**, 5827-5833
46. Echtay, K.S., Winkler, E., y Klingenberg, M. (2000) *Nature* **408**, 609-613
47. Tomás, P., Ledesma, A., y Rial, E. (2002) *FEBS Lett.* **526**, 63-65
48. Trenker, M., Malli, R., Fertschai, I., Levak-Frank, S., y Graiger, W.F. (2007) *Nature Cell Biol.* **9**, en prensa

Semblanza del Dr. Eduardo Rial



Nació en Zaragoza (España) el 26 de abril de 1959. Estudió Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias de la Universidad del País Vasco, obteniendo la Licenciatura en Grado en 1981. En enero de 1982 inició los trabajos de su Tesis Doctoral en la Universidad de Dundee (Escocia) bajo la dirección del Dr. David G. Nicholls obteniendo el grado de Doctor por la Universidad del País Vasco en 1984. Su estancia en la Universidad de Dundee se prolongó hasta octubre de 1987 fecha en que regresó a la Universidad del País Vasco. En 1988 obtuvo una plaza de Científico Titular en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España) y en 2004 fue promocionado a Investigador Científico. Desde 1989 se encuentra destinado en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC en Madrid donde dirige el grupo de Bioenergética Mitocondrial perteneciente al Departamento de Ciencia de Proteínas.

El Dr. Rial ha trabajado desde 1977 en el área de la bioenergética mitocondrial centrandó sus investigaciones en el control de la eficiencia energética de la fosforilación oxidativa. Sus aportaciones más relevantes se enmarcan en el estudio del mecanismo molecular de transporte y regulación de las proteínas desacoplantes. Asimismo, ha hecho aportaciones significativas sobre el control de la eficiencia energética en *Saccharomyces cerevisiae*. Ha publicado más de 50 trabajos en revistas internacionales que han recibido hasta la fecha más de 1200 citaciones.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LA PROTEÍNA DESACOPLANTE UCP1 DEL TEJIDO ADIPOSEO CAFÉ: MECANISMO, ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y REGULACIÓN

Eduardo Rial y María del Mar González-Barroso
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, España
rial@cib.csic.es

Resumen

El tejido adiposo café es un órgano termogénico presente sólo en mamíferos. Su alta capacidad calorífica se debe a un gran contenido en mitocondrias y a la presencia en la membrana interna de éstas de la proteína desacoplante UCP1. La UCP1 es un transportador de protones que permite la disipación controlada del gradiente de protones generado por la cadena respiratoria. La actividad de la proteína está regulada por dos ligandos. Los nucleótidos de purina mantienen la proteína inhibida en condiciones no termogénicas mientras que los ácidos grasos, actuando como segundos mensajeros de la noradrenalina, activan el transporte de protones. El mecanismo molecular de transporte y su regulación son aún controvertidos pero los datos apuntan a que los ácidos grasos actúan como grupo prostético y el carboxilato participa en la ruta de translocación de los protones. De modo más reciente se ha descrito la presencia de proteínas homólogas a la UCP1 no sólo en diferentes tejidos animales sino también en plantas e incluso en hongos. Esta amplia distribución sugiere que el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa podría ser una estrategia adoptada de modo general por los seres vivos para regular la eficiencia energética. Se han descrito toda una serie de procesos en los que las UCPs parecen jugar un importante papel. Sin embargo, el más destacado parece ser el de servir como mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo ya que, al aumentar la actividad respiratoria debido a un incremento en la fuga de protones, disminuiría la producción de especies reactivas del oxígeno.

Palabras clave: Mitocondria, Bioenergética: Transporte, Eficiencia, Proteína Desacoplante

Abstract

Brown adipose tissue is a thermogenic organ only present in mammals. Its remarkable heating capacity is mainly due to the high content of mitochondria and the presence in their inner membrane of the uncoupling protein UCP1. UCP1 is a proton carrier that allows a controlled dissipation of the proton gradient generated by the respiratory chain. The protein's activity is regulated by two ligands. Purine nucleotides maintain the protein inhibited under non-thermogenic conditions. Fatty acids act as second messengers for noradrenaline and activate the proton conductance. The molecular mechanism of transport and its regulation are still controversial but available data point to fatty acids as a prosthetic group with the carboxylate participating in the proton translocation pathway. Recently, a number of proteins homologous to UCP1 have been described not only in many phyla within the animal kingdom but also in plants and fungi. This ubiquitous presence suggests that the uncoupling of the oxidative phosphorylation may be a general strategy adopted by living organisms to adjust the energetic efficiency. UCPs have been shown to play a significant role in a variety of biological processes. However, it appears that the most prominent one would be as part of the defence mechanisms against oxidative stress. An increase in the respiratory activity due to an increased proton leakage would lead to a decrease in the production of reactive oxygen species.

Keywords: Mitochondria, Bioenergetics, Transport, Efficiency, Uncoupling Protein

Fundamentos de bioenergética

La mayoría de los procesos biológicos que necesitan energía la toman de la reacción de hidrólisis del ATP. El ATP es, por tanto, un intermediario clave en el metabolismo y se sintetiza fundamentalmente utilizando la energía que queda disponible de la oxidación de grasas y azúcares en la célula. La serie de reacciones que aseguran su producción en la mitocondria se denominan globalmente fosforilación oxidativa (revisado en [1]) (Fig. 1). Brevemente, durante la respiración mitocondrial, la oxidación de sustratos en la cadena respiratoria conlleva un flujo de electrones desde estos sustratos hasta el oxígeno. La energía disponible tras estos procesos de óxido-reducción es utilizada para bombear protones fuera de la matriz generándose, por tanto, un gradiente de potencial electroquímico de protones. La energía de este gradiente se utilizará principalmente para la producción de ATP en la H⁺-ATPasa mitocondrial pero también para el transporte de iones y metabolitos. En estado estacionario, el bombeo de protones a través de la cadena respiratoria tiene que estar estrechamente compensado por la reentrada de éstos en la matriz. Como la principal vía de reentrada es la ATPasa, la velocidad de respiración está controlada principalmente por la demanda de ATP en la célula. Se puede decir, por tanto, que la velocidad de respiración se ajusta a la demanda que hace la célula para que se sintetice ATP. Este acoplamiento tiene una importante consecuencia para la economía celular: no se malgastan las reservas.

Hay situaciones fisiológicas en las que esta eficiencia energética debe sacrificarse. Un caso paradigmático es la termogénesis inducida por el frío. Cuando un mamífero recién nacido es expuesto al frío, un tejido especializado, el tejido adiposo café, acelera la quema de sustratos y la energía se libera en forma de calor. Para conseguir burlar el acoplamiento de la fosforilación oxidativa, las mitocondrias de los adipocitos café tienen una proteína que permite que los protones vuelvan a la matriz sin que haya síntesis de ATP (Fig. 1). Se acelera, por tanto, la respiración y se disipa la energía del gradiente de protones en forma de calor. Debido a su función, a esta proteína se la ha denominado proteína desacoplante (abreviada UCP, del inglés “*uncoupling protein*”) (revisado en [2]). En la naturaleza existen otros mecanismos termogénicos que no requieren de proteínas desacoplantes. Por una parte, están aquellos procesos disipadores de energía que implican una gran demanda de ATP como la tiritación o los ciclos

fútiles y por otra, mecanismos que permiten modificar la estequiometría del bombeo de protones en la cadena respiratoria para hacerla menos eficiente [3].

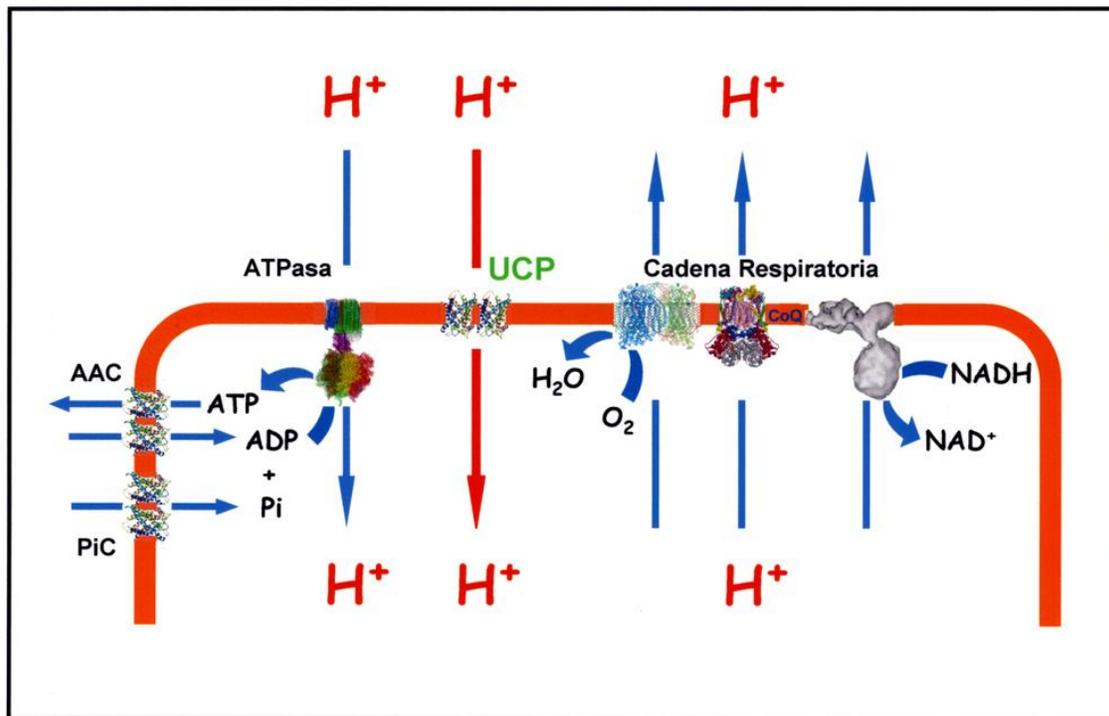


Figura 1. Esquema de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Los sustratos como el NADH son oxidados en la cadena respiratoria y el flujo de electrones desde estos sustratos hasta el oxígeno se encuentra acoplado al bombeo de protones hacia el exterior de la mitocondria. Se genera un gradiente de protones que sirve como reservorio de energía y que se utiliza para generar ATP o para transportar iones y metabolitos. Se muestra la translocasa de adenín nucleótidos (AAC) y el transportador de fosfato (PiC). Las proteínas desacoplantes (UCP) permiten la reentrada de los protones a la matriz, disipando la energía del gradiente en forma de calor.

La familia de las proteínas desacoplantes

El tejido adiposo café es un órgano termogénico y la proteína desacoplante UCP1 la clave de su gran capacidad para producir calor. La proteína responsable de la actividad desacoplante fue identificada en 1978 por Nicholls y colaboradores como una proteína de 32 kDa que se marcaba con [³²P]-azido-ATP desde la cara citosólica y cuya unión podía desplazarse con GDP pero era insensible a atractilato [4]. Dos años antes Ricquier y colaboradores habían descrito que una banda proteica de 32 kDa aumentaba de modo muy notable en mitocondrias de tejido adiposo café de ratas que habían sido expuestas al frío [5]. Estos autores no la relacionaron con el sitio de disipación de energía y supusieron que se trataba de una flavoproteína o de algún tipo de citocromo de función desconocida. Los dos grupos habían identificado la misma proteína con dos aproximaciones diferentes. Durante dos décadas se consideró a la UCP1 como una proteína singular sólo presente en un tejido altamente especializado que es exclusivo de mamíferos.

En 1997, Ricquier y su grupo identificaron una proteína que mostraba un 59% de identidad con la UCP1 y que se denominó UCP2 [6]. En contraste con la UCP1, la UCP2 muestra un patrón de expresión que la hace prácticamente ubicua (tejido adiposo blanco y café, cerebro, músculo, macrófagos, células β-pancreáticas, estómago, intestino, etc.) (Fig. 2). Con

pocos meses de diferencia se describió una nueva proteína homóloga, la UCP3, que presentaba un 54-57% de identidad con UCP1 y 73% con la UCP2 [7]. Esta proteína se expresa casi exclusivamente en músculo esquelético y tejido adiposo café. Otras dos proteínas, UCP4 y BMCP1, fueron descritas poco después aunque evolutivamente se encuentran mucho más distantes. Los programas de secuenciación de genomas han puesto de manifiesto que los genes que codifican proteínas homólogas a la UCP1 tienen una distribución muy amplia, habiéndose encontrado no sólo en todo el reino animal sino también en plantas e incluso en organismos unicelulares (revisado en [8]). Esta amplia presencia sugiere que el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa podría ser una estrategia adoptada de modo general para regular la eficiencia energética. En cualquier caso conviene reseñar que un cierto grado de homología no puede ser traducido en una misma función y que habrá que esperar a que datos bioquímicos determinen si un producto génico determinado es capaz de modular la eficiencia de la fosforilación oxidativa.

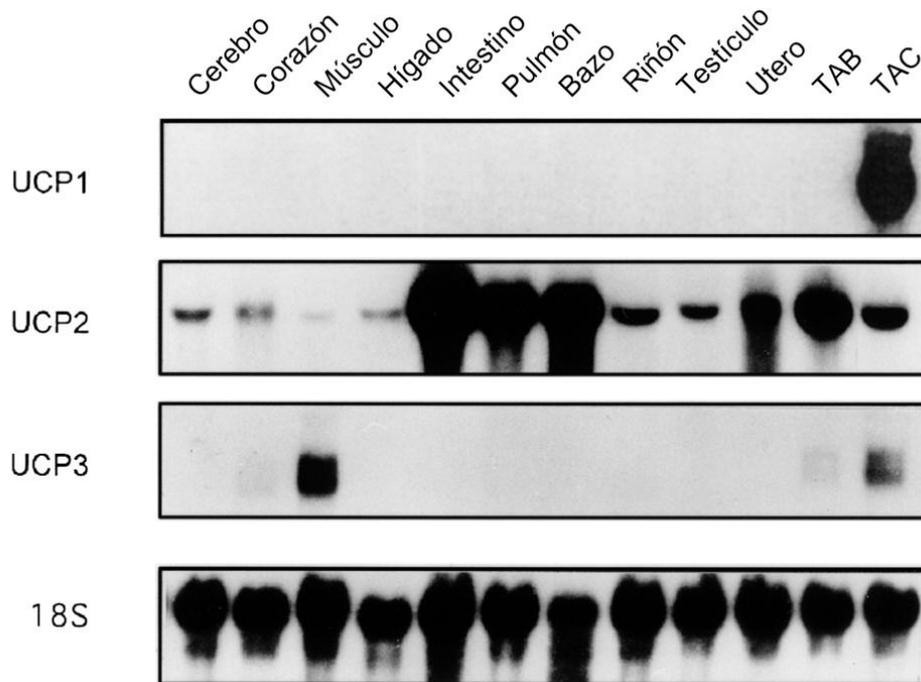


Figura 2. Niveles de ARNm de las proteínas desacoplantes UCP1, UCP2 y UCP3 en diferentes órganos y tejidos de ratón. TAB, tejido adiposo blanco; TAC, tejido adiposo café. Los niveles del ARNr 18S se muestran como control de la carga de muestra en el gel. Adaptado de [9].

Diez años después de su descubrimiento, y a pesar de que se hayan publicado durante este tiempo cerca de un millar de artículos, la función biológica de las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3 sigue siendo extraordinariamente controvertida (revisado en [10]). Desde su descubrimiento, a las nuevas UCPs se las ha relacionado con funciones biológicas tan distintas como la termogénesis, la eliminación de un exceso de calorías o el mantenimiento del balance redox. Sin embargo, la idea que está tomando más fuerza implica a la UCP2, y posiblemente a la UCP3, en el control de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), constituyendo un mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo (revisado en [11]). La aceleración de la respiración debido al desacoplamiento inducido por una UCP llevaría a una reducción de la producción de ROS por la cadena respiratoria. De hecho, el primer fenotipo que se describió en el ratón *knock-out* para la UCP2 fue, curiosamente, unos mayores niveles de ROS en los macrófagos, lo cual confirió a estos ratones una mayor resistencia a la infección por toxoplasma.

En este mismo sentido, se ha descrito que la UCP2 protege frente al estrés oxidativo tras la isquemia. Se ha observado un efecto activador directo del radical superóxido sobre la actividad translocadora de protones, no sólo de la UCP2 sino también de la UCP1 y UCP3, por lo que se ha propuesto que esta es la base molecular del mecanismo protector y que, por tanto, se pondría en marcha cuando hay un aumento de niveles de ROS (revisado en [11,12]). Por ejemplo, en células tumorales aumenta la expresión de UCP2 como mecanismo de defensa frente a agentes anti-cancerosos que actúan provocando estrés oxidativo [13]. Del mismo modo, ciertas patologías que implican disfunciones de la célula β -pancreática (hiperglicemia, hiperlipidemia, etc.) causan un aumento de niveles de ROS y como respuesta aumenta la expresión de UCP2 (revisado en [11]).

Existe otra propuesta para el papel de la UCP2 y UCP3 derivada de la observación del aumento de la expresión de estas proteínas en músculo cuando se están utilizando ácidos grasos como fuente de energía. Este aumento se produce incluso cuando se han movilizado los ácidos grasos como consecuencia de una situación de ayuno y, por tanto, no debería tener una función disipadora de energía. La propuesta es que estas proteínas desacoplantes son transportadores de ácidos grasos o, incluso, de productos de su peroxidación. Según esta hipótesis, los ácidos grasos libres se acumularían en la mitocondria debido a su capacidad de cruzar protonados la membrana interna. Para evitar su acumulación en la matriz, las UCPs catalizarían su salida de la mitocondria. Esta propuesta deriva del ciclo protonofórico propuesto por Skulachev para explicar la participación de determinados transportadores mitocondriales en el desacoplamiento causado por los ácidos grasos de cadena larga [14] (ver más adelante).

Las proteínas desacoplantes forman parte de una superfamilia de proteínas que incluye a todos los transportadores de metabolitos de la membrana interna mitocondrial ("*solute carrier family 25*" o SLC25) (revisado en [15]). La característica más notable de esta familia es que todos sus miembros tienen una secuencia de unos 100 aminoácidos que se repite tres veces. Cada dominio a su vez, contiene dos regiones hidrofóbicas transmembranales unidas por una larga región hidrofílica (Fig. 3). La conexión entre los tres dominios tiene lugar mediante otra pequeña región hidrofílica. El análisis de la secuencia de estos transportadores ha revelado la presencia de dos motivos conservados que se encuentran en los dos extremos de la larga asa hidrofílica. El primero, P-x-(D/E)-x₂-(R/K), está en el extremo C-terminal de la primera hélice de cada repetición mientras que el segundo, (E/D)-G-x₄-(aromático)-(K/R)-G, está en el extremo C-terminal del asa. Estas dos secuencias se han utilizado para definir un perfil denominado *Solcar* (número de acceso PROSITE PS50920) que se utiliza para identificar nuevos miembros de esta familia de proteínas. La gran homología existente entre los dominios y a su vez entre todos estos transportadores, hace pensar que esta familia se originó tras la triplicación de una secuencia ancestral común y a partir de la cual han surgido los distintos transportadores mitocondriales (revisado en [16]). Los extremos carboxi- y amino-terminal se encuentran en el lado citosólico de la membrana interna por lo que las largas asas de conexión entre los tres dominios se encuentran en el lado de la matriz. La resolución de la estructura tridimensional de la AAC ha confirmado la topología de esta familia de proteínas que se había postulado con base en los análisis de secuencia [17].

Regulación fisiológica de la actividad de la UCP1

La baja eficiencia energética de las mitocondrias de tejido adiposo café se conocía desde los años sesenta y enseguida se le relacionó con el papel termogénico del tejido (revisado en [18,19]). En un principio se pensó que esta disminución en el rendimiento energético podía ser consecuencia de la pérdida de la maquinaria del proceso de fosforilación oxidativa. Sin embargo, esta posibilidad se descartó cuando se demostró que el control respiratorio volvía a valores comparables a otras mitocondrias cuando al medio de incubación se añadían nucleótidos de purina (ATP o GDP) y se eliminaban los ácidos grasos endógenos (revisado en [19]). *In vivo*, el ATP citosólico se une a la UCP1 desde la cara matricial de la proteína y su función fisiológica

es, por tanto, mantener la proteína inhibida en condiciones no termogénicas.

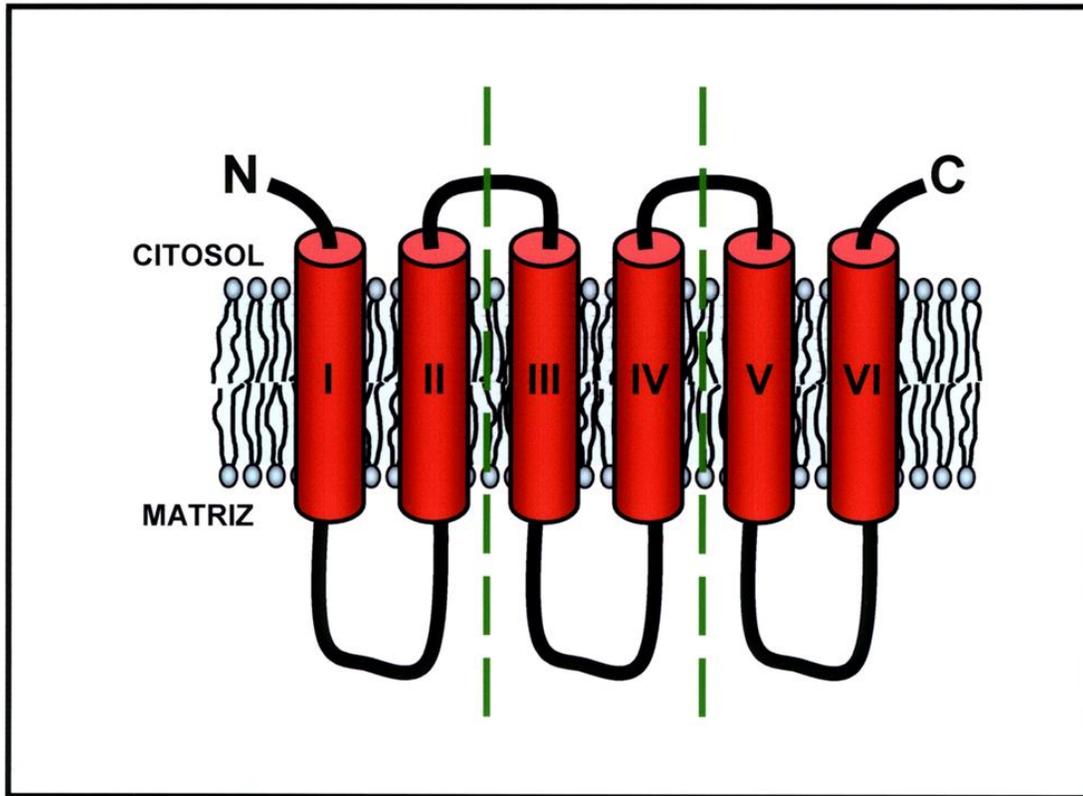


Figura 3. Estructura tripartita de los miembros de la familia de transportadores de metabolitos de la membrana interna mitocondrial. Cada dominio tiene dos regiones transmembranales unidas por un largo dominio hidrofílico expuesto a la matriz mitocondrial.

La capacidad de los ácidos grasos para desacoplar la fosforilación oxidativa en todo tipo de mitocondrias es una propiedad bien conocida y fue descrita por primera vez por Pressman y Lardy en 1952 [20]. Pronto quedó claro que a altas concentraciones los ácidos grasos actuaban a modo de detergente sobre cualquier tipo de mitocondrias pero, por otra parte, también se observó que bajas concentraciones ejercían una función protonófora equivalente a la producida por otros desacoplantes típicos (revisado en [21]). Esta acción protonófora requería un movimiento de translocación de la forma protonada de los ácidos grasos desde la cara citosólica de la membrana mitocondrial interna hasta la cara matricial (*flip-flop*). Aquí liberaría un protón, y posteriormente la forma aniónica tendría que regresar a la cara citosólica. En 1988, Skulachev y colaboradores descubrieron que el carboxiatractilato podía inhibir parcialmente el desacoplamiento inducido por los ácidos grasos en mitocondrias de hígado [22]. Esto hizo que se implicase a la translocasa de adenín nucleótidos (AAC) en el mecanismo del desacoplamiento, y propusieron que el retorno de la forma aniónica de los ácidos grasos hacia la cara citosólica de la membrana interna era facilitado por el propio transportador. Este comportamiento se comprobó en liposomas con AAC reconstituido y en otros transportadores mitocondriales como el de aspartato/glutamato (AGC), dicarboxilato (DIC), fosfato (PIC) o las propias UCPs (revisado en [23]).

El hecho de que los ácidos grasos fueran desacoplantes inespecíficos de todo tipo de mitocondrias hacía poco atractiva la hipótesis de que fueran los reguladores fisiológicos de la UCP1. Esto a pesar de que se había observado que las mitocondrias de tejido adiposo café eran desacopladas con concentraciones mucho más bajas que las del resto de tejidos (revisado en

[23]). El papel regulador se pudo establecer en los años ochenta cuando se diseñaron experimentos en los que se reproducía la transición al estado termogénico en células y mitocondrias aisladas simulando la lipólisis que induce la noradrenalina. Para ello, se añadía lentamente palmitato a una incubación de mitocondrias en las que había ATP, CoA y carnitina mientras se monitorizaba el consumo de oxígeno y las variaciones en el potencial de membrana. Estos experimentos demostraron que la conductancia a los protones se relacionaba de modo preciso con la concentración de palmitato libre y cuando éste era metabolizado, y desaparecía del medio de incubación, el potencial de membrana se recuperaba y se restablecía el control respiratorio. Se demostró, además, que la sensibilidad de las mitocondrias al palmitato dependía de la presencia de la UCP1 ya que mitocondrias aisladas de tejido adiposo café de animales que no habían sido expuestos al frío (sin UCP1) se comportaban como las mitocondrias de hígado (revisado en [19]). Con posterioridad se han confirmado estas observaciones tanto en levaduras que expresan UCP1 de modo recombinante [24] como en ratones *knock-out* para la UCP1 [25]. En ambos sistemas, la presencia de la UCP1 confiere una alta sensibilidad a los ácidos grasos.

La regulación fisiológica de la termogénesis en el tejido adiposo café está, por tanto, bien establecida a nivel celular (Fig. 4). El hipotálamo envía la señal de inicio de la termogénesis a través del sistema nervioso simpático. La noradrenalina, liberada por las numerosas fibras simpáticas que inervan el tejido adiposo café, se une a los receptores β 3-adrenérgicos de los adipocitos activando la adenilato ciclasa y causando un aumento de los niveles citoplásmicos de cAMP. Este aumento de cAMP desencadena una cascada lipolítica al activarse una lipasa sensible a hormonas que moviliza las reservas de triglicéridos. Los ácidos grasos liberados van a jugar un doble papel. Por un lado van a ser el sustrato que será oxidado en las mitocondrias pero, además, actúan sobre la UCP1 activando el transporte de protones y, por tanto, la disipación del gradiente de protones en forma de calor. Los ácidos grasos ejercen, por consiguiente, el papel de segundos mensajeros de la noradrenalina (revisado en [2,19]).

Mecanismo molecular de transporte de la UCP1

Aunque el papel de los ácidos grasos como reguladores fisiológicos de la UCP1 está bien aceptado, el mecanismo molecular de su acción sigue siendo controvertido. El eje de las discrepancias se encuentra en la especie que es transportada por la UCP1. Mientras que un grupo de autores defienden que la UCP1 es un transportador de protones, otros grupos defienden que la UCP1 es un transportador de aniones y los ácidos grasos son uno de los sustratos que pueden transportar.

Los sustratos que transportan la mayoría de los miembros de la familia mitocondrial de transportadores de metabolitos son aniónicos. Los primeros estudios de bioenergética llevados a cabo con la UCP1 demostraron que las mitocondrias de tejido adiposo café presentaban una alta permeabilidad a aniones que pronto se relacionó con la presencia de la UCP1 [26]. La competencia observada entre el transporte del anión cloruro y los protones indicaba que existía una vía común para el transporte de protones y aniones. Esta observación llevó a la propuesta de que durante el proceso de disipación del gradiente de potencial electroquímico, la UCP transportaba el anión hidroxilo, lo cual experimentalmente es indistinguible de un uniporte de protones [27]. Posteriormente otros autores describieron que la UCP1 podía transportar muchos otros aniones entre los que cabría destacar sulfonatos y alquilsulfatos [28]. La velocidad de transporte y su afinidad aumentaban con la hidrofobicidad del sustrato. A raíz del antes mencionado descubrimiento de que el carboxiatractilato inhibía parcialmente el desacoplamiento originado por el palmitato en mitocondrias de hígado [22], se propuso una hipótesis según la cual, en condiciones fisiológicas, la UCP1 es exclusivamente un transportador de ácidos grasos [29]. Según este modelo, los ácidos grasos son transportados por la UCP1 hacia el lado citosólico de la membrana interna en su forma aniónica de modo semejante al que ocurre en otros transportadores mitocondriales, es decir, de modo electroforético. La translocación de los protones a la matriz ocurriría a través de la bicapa lipídica mediante un movimiento de *flip-flop*. El

ácido graso captaría el protón en el lado citosólico y lo liberaría en el lado de la matriz completándose así un ciclo cuyo resultado neto sería la translocación de un protón en la matriz. En este modelo, en ausencia de ácidos grasos no hay transporte.

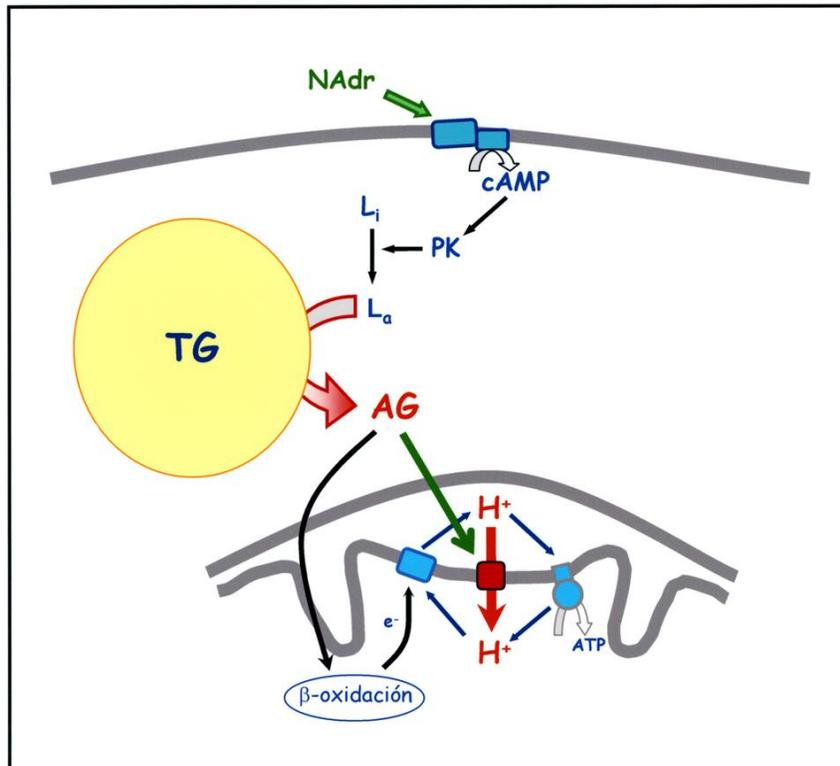


Figura 4. Regulación de la termogénesis en el tejido adiposo café. La noradrenalina (NAdr) liberada por las terminales nerviosas simpáticas se une a un receptor β -adrenérgico y desencadena una cascada lipolítica en las que se movilizan las reservas de triglicéridos (TG). Los ácidos grasos liberados (AG) son oxidados en la mitocondria. Los ácidos grasos activan la UCP1 aumentando su conductancia a los protones. Este desacoplamiento de la fosforilación oxidativa hace que se acelere la respiración y que la energía del gradiente de protones se libere en forma de calor.

Existe una hipótesis alternativa que postula que la UCP1 es un transportador de protones y los ácidos grasos actúan como grupo prostético facilitando la translocación [30,31]. En este modelo el grupo carboxilato del ácido graso participa en la ruta de translocación de los protones. Es importante señalar que para el estudio del mecanismo de transporte y regulación de la UCP1 hay que diferenciar entre las propiedades de la proteína en ausencia y en presencia de nucleótidos. Es conocido desde los años sesenta que en ausencia de nucleótido, la UCP1 facilita el paso de una gran variedad de sustratos de naturaleza aniónica [26,28]. Esta situación no es fisiológica ya que, *in vivo*, la concentración citosólica de ATP es lo suficientemente alta como para mantener saturado el centro de unión. Cabe resaltar que una caída en los niveles de ATP citosólico, con el consiguiente incremento en los niveles de ADP, no alteraría de modo significativo la actividad de la UCP1 ya que el ADP es también un ligando inhibitorio de la proteína [32]. Aunque la actividad de la UCP1 en ausencia de nucleótidos no es de relevancia fisiológica, la información que aporta es importante para discriminar entre distintos mecanismos de transporte.

Los primeros experimentos de bioenergética realizados con mitocondrias de tejido

adiposo café establecían de modo inequívoco que, para obtener mitocondrias acopladas, no sólo era necesario retirar los ácidos grasos de las preparaciones sino que, además, era necesaria la presencia de nucleótidos [33]. La actividad transportadora de la UCP1 en ausencia de los dos ligandos reguladores, nucleótidos y ácidos grasos, es una cuestión crucial debido a sus profundas implicaciones en el mecanismo molecular de transporte. Si el desacoplamiento observado en las mitocondrias del tejido adiposo café necesitara de la translocación de ácidos grasos a través de la UCP1, en su ausencia, no deberíamos observar desacoplamiento. Si por el contrario, la UCP1 es un transportador de protones y los ácidos grasos son sólo un regulador, se podría ver actividad en su ausencia.

El aislamiento de mitocondrias de tejido adiposo café presenta una complicación adicional para analizar esta cuestión debido a las reservas de triglicéridos de los adipocitos. Garland y colaboradores señalaron que la actividad que se observa en ausencia de ácidos grasos no es tal ya que durante la homogenización del tejido, y salvo que se empleen altas concentraciones de albúmina, los ácidos grasos se unen a las membranas mitocondriales y no es posible retirarlos [34]. Para evitar este problema se han utilizado mitocondrias de levaduras que expresan UCP1 aisladas en presencia de albúmina y de un inhibidor de la actividad fosfolipasa mitocondrial. En estas condiciones se detecta una actividad basal inhibible por nucleótidos en ausencia de ácidos grasos y que no está presente en mitocondrias control [24]. Además, se han reexaminado los experimentos hechos con mitocondrias de tejido adiposo café utilizando durante la homogenización concentraciones de albúmina de hasta 50 mg/ml y tomando precauciones adicionales para minimizar la presencia de ácidos grasos endógenos. En esas condiciones, y en ausencia de nucleótidos, las mitocondrias de tejido adiposo café muestran una tasa de respiración muy similar a la que se observa en presencia del desacoplante FCCP [23]. Estos experimentos revelan un aspecto crítico sobre la actividad de la UCP1 que debe ser entendido completamente. Es posible que, incluso después de un aislamiento en presencia de elevadas concentraciones de albúmina, no hubiera sido posible eliminar las últimas trazas de ácidos grasos. Sin embargo, la pregunta que hay que responder es por qué la velocidad de respiración es máxima. Existen dos posibles respuestas:

(1) que esos ácidos grasos residuales representen una concentración saturante y esto haga que la UCP1 refleje una actividad máxima. De ser este el caso, surgirían dos nuevos interrogantes: ¿cuál es la K_m de los ácidos grasos y por qué estos ácidos grasos no se equilibran con la albúmina?. La respuesta podría ser que la afinidad ácido graso-UCP1 es tan alta que los ácidos grasos permanecen "secuestrados" por la UCP1 y no se equilibran con la fase lipídica de la membrana. Esta explicación haría difícil entender la regulación fisiológica de la termogénesis en la que los ácidos grasos juegan el papel de segundos mensajeros de la noradrenalina ya que no sería posible revertir la activación. Como se ha dicho anteriormente, la activación de la UCP1 es reversible. Además, esta unión estable no sería compatible tampoco con la hipótesis que se basa en un ciclaje de los ácidos grasos, ya que se precisa un equilibrio entre el ácido graso y la membrana para que se pueda producir el *flip-flop*. En cualquier caso, esta K_m tan extremadamente baja no corresponde con los valores experimentales obtenidos [35].

(2) que en ausencia de nucleótidos la UCP1 tenga una elevada conductancia a protones que sea independiente de la presencia de ácidos grasos. Esta posibilidad es la que se barajó tras los primeros experimentos de bioenergética con mitocondrias de tejido adiposo café (revisado en [19,23]).

La existencia de una elevada conductancia a protones en ausencia de nucleótidos y ácidos grasos parece indicar que la UCP1 es un transportador de protones. Hay, además, otras evidencias que permiten descartar el modelo basado en un ciclo protonofórico en el que los ácidos grasos sean los sustratos de la UCP1. Como se dijo anteriormente, los alquilsulfonatos pueden ser transportados por la UCP1 al igual que otros aniones. El undecanosulfonato presenta un cierto parecido a los ácidos grasos, pero al ser el pKa del grupo sulfónico mucho menor que el del grupo carboxilo, no se protona a pH fisiológico y, por tanto, son incapaces de hacer *flip-flop*

[29]. Este sería un paso necesario para que el undecanosulfonato pudiera completar el ciclo protonofórico y provocar, por tanto, el desacoplamiento de la respiración. Sin embargo, experimentos hechos con mitocondrias de tejido adiposo café han demostrado que el undecanosulfonato aumenta la conductancia a protones siendo inhibible por GDP, aunque las concentraciones de undecanosulfonato que se precisan para obtener el efecto son casi un orden de magnitud más alta que con palmitato [23]. Como el undecanosulfonato no puede hacer *flip-flop*, la hipótesis basada en el ciclaje de los ácidos grasos no puede ser la base del mecanismo de activación de la UCP1 y los datos disponibles parecen apuntar a que actúan como grupo prostético que activa el paso de los protones. En este modelo el grupo carboxilo del ácido graso participa en la ruta de translocación jugando un papel que recordaría, en cierta medida, al del retinal en la bacteriorodopsina (revisado en [36]).

Se han identificado una serie de residuos que podrían estar implicados en el transporte de los protones. Así, la sustitución del aspártico 27 (Asp27Asn) o del aspártico 210 (Asp210Asn) reduce de modo drástico el transporte de protones sin afectar al de aniones, habiéndose propuesto que el aspártico 210 media en la captación de los protones desde el lado citosólico, mientras que el 27 participaría en la ruta de translocación en el interior de la proteína [37]. También se ha propuesto la participación del par de histidinas 145-147 en el transporte de protones aunque esto ha sido motivo de controversia [38]. Su ausencia en la UCP2 y el hecho de que en la UCP3 sólo se encuentre la His145 llevó incluso a que se planteara que estas nuevas UCPs no transportaban protones. Sin embargo, otros autores generaron el doble mutante His145Asn/His147Asn y no observaron ningún efecto [39]. Nuestro grupo ha reexaminado recientemente el papel del par de histidinas generando una proteína quimera en la que la región del asa citosólica que contiene estos residuos se ha reemplazado por la región homóloga de la UCP2, observándose de nuevo unas propiedades bioenergéticas iguales que en la proteína original [40]. En este trabajo se realizó un análisis filogenético de las UCPs con el fin de identificar los residuos que evolutivamente son característicos de la UCP1 (sinapomorfías), llevándose a cabo un extenso programa de mutagénesis para identificar aquellos que son claves para la actividad. Se identificó al glutámico 134 como esencial para la conductancia basal a los protones, es decir, la que se observa en ausencia de nucleótidos y ácidos grasos. Sin embargo, este residuo no es esencial para el transporte de protones en presencia de ácidos grasos por lo que apunta a que en presencia de nucleótidos, los ácidos grasos inducen una ruta alternativa para los protones (Fig. 5) [40].

El sitio de unión de los nucleótidos

Las UCPs y el AAC interaccionan en condiciones fisiológicas con nucleótidos aunque lo hacen de un modo diferente al resto de proteínas que unen nucleótidos: en ambas el ión Mg^{2+} no participa en la unión ya que durante su ciclo catalítico no se da la hidrólisis/formación de enlaces fosfato-fosfato. No sorprende, por tanto, que no presenten ninguno de los dominios consenso característicos de los enzimas que hidrolizan/sintetizan ATP (revisado en [41]). Sin embargo, ambos transportadores son funcionalmente muy diferentes. Desde el punto de vista de la unión, en la UCP1 los nucleótidos interaccionan con la proteína desde el lado citosólico y únicamente lo hacen para inhibir el transporte, mientras que en el AAC la interacción se da a ambos lados de la membrana y los nucleótidos constituyen el sustrato que se transporta. Esto implica importantes diferencias en cuanto a la afinidad y especificidad. Mientras que el AAC presenta una mayor especificidad con una menor afinidad aparente, la UCP1 se muestra más afín y menos específica. Esto se debe a que en el AAC el nucleótido debe ser translocado por lo que su unión a la proteína implica importantes cambios conformacionales que hacen variar la constante de afinidad que se observa. Además, la mayor especificidad observada en el AAC implica una interacción proteína- nucleótido mucho más estrecha ya que es esta energía de unión la que conduce la translocación de los nucleótidos. La unión provoca un cambio en la conformación del sitio de unión a un estado de baja afinidad que facilita la liberación del nucleótido. La aparente mayor afinidad y menor especificidad de la UCP1 debe ser consecuencia de que el nucleótido es

un inhibidor y que su unión no ocasiona cambios conformacionales drásticos, sino un ligero reordenamiento de la proteína (revisado en [42]). La unión del nucleótido a la UCP1 es lenta y se produce a través de dos estados. En el primer estado la interacción es débil y no provoca inhibición. Un cambio conformacional posterior llevaría al segundo estado en el que la unión es fuerte y correlaciona con la inhibición del transporte (revisado en [42]).

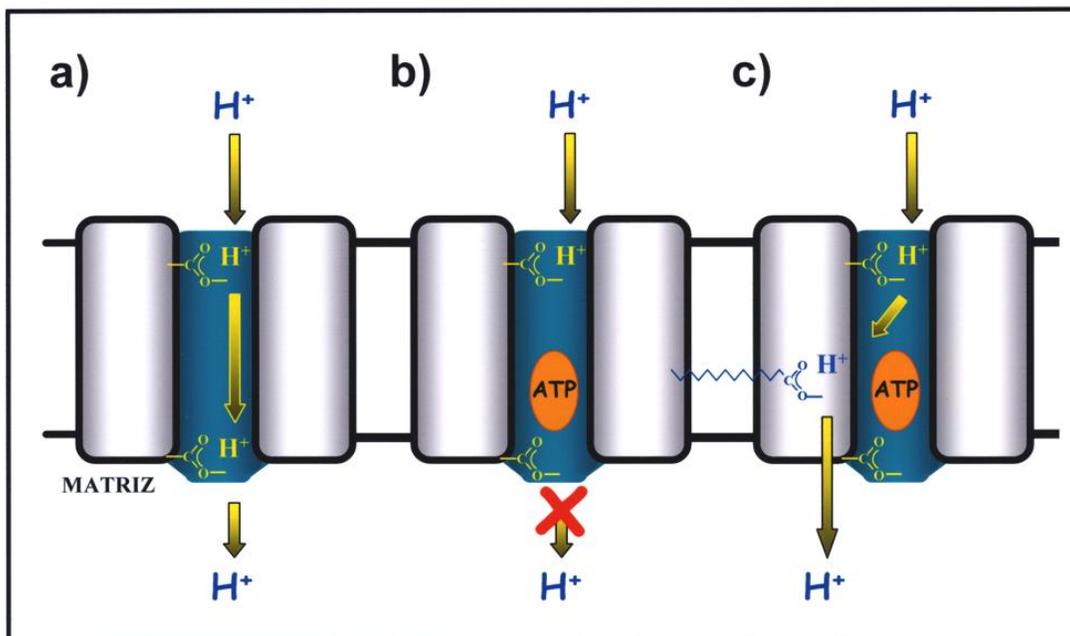


Figura 5. Esquema de la regulación de la actividad transportadora de protones de la UCP1. a) En ausencia de nucleótidos y ácidos grasos la proteína presenta una alta conductancia a los protones. b) El nucleótido accede a su sitio de unión desde la cara citosólica de la proteína e inhibe el transporte de protones. c) Los ácidos grasos actúan como segundos mensajeros de la noradrenalina y aumentan la conductancia a los protones eludiendo la inhibición impuesta por el nucleótido.

La localización del sitio de unión de los nucleótidos no es posible definirla aún con precisión. Los datos de marcaje de fotoafinidad fueron los primeros que aportaron información al demostrar que el nucleótido interacciona con residuos del interior del barril de hélices, en la región hidrofílica que conecta la quinta y sexta hélices transmembranales [43]. Estos resultados y el análisis de los datos disponibles de mutagénesis, espectroscópicos y modificaciones químicas nos permitieron proponer un modelo estructural para el sitio de unión del nucleótido en la UCP1 [41]. En este modelo, el ligando penetra en el barril de hélices α por el lado citosólico llegando hasta la zona más profunda de la proteína e interaccionando con las tres asas matriciales. Las asas formarían un bolsillo hidrofóbico en el que se alojaría el anillo de purina mientras que la cadena polifosfato estaría orientada hacia el centro del barril de modo que las cargas negativas interaccionarían con los residuos de arginina 83, 182 y 276 que se encuentran en los segmentos transmembrana II, IV y VI.

El sitio de unión de los ácidos grasos

La identificación del sitio de unión del ligando activador se ha visto complicada por los pocos requerimientos estructurales de los activadores de la UCP1: cualquier compuesto aniónico monovalente con una hidrofobicidad suficiente que le permita una cierta solubilidad en medio lipídico puede activar la UCP1 (revisado en [31]). La necesidad del carboxilo libre, o la presencia

de otro grupo protonable, se interpreta como reflejo de una implicación directa de éste en el mecanismo de transporte de protones. En general, se tolera la presencia de grupos voluminosos a lo largo de la molécula pero no ocurre lo mismo si éstos se encuentran al final de la cadena. Así, el ácido 4-heptil-benzoico es activo mientras que el 6-fenil-hexanoico no lo es. Sin embargo, el patrón no es tan sencillo ya que tanto el ácido todo-*trans* retinoico como una larga serie de retinoides son potentes activadores de la UCP1 a pesar de que poseen grupos voluminosos alejados del grupo carboxilo [44]. Hay que reseñar, que el ácido todo-*trans* retinoico y el retinoide TTNPB muestran una afinidad por la UCP1 mucho mayor que la del palmitato [45]. En cuanto a la presencia de grupos hidrofílicos en la estructura del activador, existe una cierta tolerancia siempre que se mantenga la solubilidad en el medio lipídico. Es curioso, sin embargo, que la sustitución del propenilo central del TTNPB por un grupo amida en el retinoide AM580 lleva a una pérdida total de la capacidad de activación. Posiblemente la rigidez de estos retinoides impide que, en este caso, el grupo polar introducido pueda ser acomodado en el sitio de unión. El descubrimiento de la ubiquinona como un cofactor esencial para la activación de la UCP1 [46] así como la observación de su capacidad facilitadora de la unión del ácido retinoico a la proteína [47] son argumentos que apoyarían la idea de que el acceso al sitio de unión debe ocurrir por difusión lateral desde la fase lipídica de la membrana interna mitocondrial. Nosotros hemos postulado que este sitio podría estar en la interfaz entre dos hélices transmembranales [44] y que, como los retinoides son moléculas alargadas con poca flexibilidad, el bolsillo hidrofóbico debe ser de al menos 15 Å.

Consideraciones finales

La fisiología del tejido adiposo café y su papel en la termogénesis sin tiritación ha sido objeto de estudio durante las últimas cuatro décadas. El papel central de la proteína desacoplante UCP1 es conocido desde los años setenta y a pesar de haber sido objeto de intenso estudio y debate durante tres décadas existen aún puntos esenciales sobre su mecanismo de transporte y regulación sobre los que no hay consenso. Al igual que ocurre con muchas otras proteínas transportadoras, estos estudios se encuentran limitados por las dificultades de obtener datos estructurales a alta resolución. En las bases de datos del “*Protein Data Bank*” (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) se encuentran en la actualidad la estructura tridimensional de alrededor de 45000 proteínas de las cuales menos de 200 corresponden a proteínas de membrana. En el año 2003 se publicó la única estructura disponible hasta la fecha de un miembro de la familia de transportadores mitocondriales, la estructura de la translocasa de adenín nucleótidos (AAC) en la conformación que adquiere cuando está unida al inhibidor carboxiatractilato [17]. Esta estructura ha ayudado en gran medida a entender la organización espacial de todos los miembros de la familia pero no resuelve las cuestiones centrales sobre el mecanismo de catálisis y las reorganizaciones inherentes al proceso de translocación. El modelado de la estructura de otros miembros de esta familia utilizando la estructura de la AAC no ha aportado de momento respuestas a las preguntas fundamentales.

En la última década ha aparecido un número creciente de proteínas que presentan una gran homología con la UCP1. Estas proteínas han sido denominadas “proteínas desacoplantes” a pesar de que su función fisiológica aún está por dilucidar. Los datos bioquímicos sobre la actividad de estas proteínas son mucho más controvertidos que los de la UCP1 ya que ni siquiera existe consenso sobre si actúan como reguladores de la eficiencia energética de la fosforilación oxidativa. Un trabajo reciente ha presentado evidencias de que tanto la UCP2 como la UCP3 podrían estar implicadas en el transporte de calcio a la mitocondria [48]. Esta publicación va a generar de nuevo controversia en un campo que ha despertado un enorme interés debido a la asociación de estas proteínas con un número creciente de patologías [11].

Agradecimientos

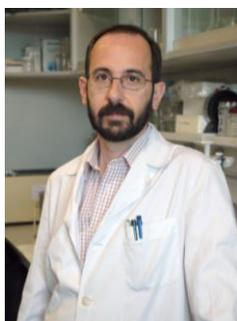
El trabajo de investigación desarrollado por nuestro grupo se encuentra financiado por el Plan Nacional de I+D del Ministerio de Educación y Ciencia español (BFU2006-08182).

Referencias

1. Nicholls, D.G., y Ferguson, S.J. (2002) *Bioenergetics 3*, Academic Press, Londres
2. Nicholls, D.G., y Locke, R.M. (1984) *Physiol. Rev.* **64**, 1-64
3. Silva, J.E. (2006) *Physiol Rev.* **86**, 435-464
4. Heaton, G.M., Wagenvoort, R.J., Kemp, A., y Nicholls, D. G. (1978) *Eur. J. Biochem.* **82**, 515-521
5. Ricquier, D., y Kader, J.C. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **73**, 577-583
6. Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D., y Warden, C.H. (1997) *Nature Genet.* **15**, 269-272
7. Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., y Giacobino, J.P. (1997) *FEBS Lett.* **408**, 39-42
8. Ledesma, A., García de Lacoba, M., y Rial, E. (2002) *Genome Biol.* **3**, 3015.1-3015.9
9. Ricquier, D., y Bouillaud, F. (2000) *Biochem. J.* **345**, 161-179
10. Nedergaard, J., Ricquier, D., y Kozak, L.P. (2005) *EMBO Rep.* **6**, 917-921
11. Krauss, S., Zhang, C.Y., y Lowell, B.B. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 248-261
12. Esteves, T.C., y Brand, M.D. (2005) *Biochim Biophys Acta.* **1709**, 35-44
13. Harper, M.E., Antoniou, A., Villalobos-Menuy, E., Russo, A., Trauger, R., Vendemelio, M., George, A., Bartholomew, R., Carlo, D., Shaikh, A., Kupperman, J., Newell, E.W., Bespalov, I.A., Wallace, S.S., Liu, Y., Rogers, J.R., Gibbs, G.L., Leahy, J.L., Camley, R.E., Melamede, R., y Newell, M.K. (2002) *FASEB J.* **16**, 1550-1557
14. Goglia, F., y Skulachev, V.P. (2003) *FASEB J.* **17**, 1585-91
15. Palmieri, F. (2004) *Pflugers Arch.* **447**, 689-709
16. Saier, M.H., Jr. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 5029-5035
17. Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G.J.M., y Brandolin, G. (2003) *Nature* **426**, 39-44
18. Smith, R.E., y Horwitz, B.A. (1969) *Physiol. Rev.* **49**, 330-425
19. Rial, E., y González-Barroso, M.M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 70-81
20. Pressman, B.C., y Lardy, H.A. (1952) *J. Biol. Chem.* **197**, 547-556
21. Wojtczak, L., y Schönfeld, P. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 41-57
22. Andreyev, A.Yu., Bondareva, T.O., Dedukhova, V.I., Mokhova, E.N., Skulachev, V.P., y Volkov, N.I. (1988) *FEBS Lett.* **226**, 265-269
23. Rial, E., Aguirregoitia, E., Jiménez-Jiménez, J., y Ledesma, A. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1608**, 122-130
24. Gonzalez-Barroso, M. M., Fleury, C., Bouillaud, F., Nicholls, D. G., y Rial, E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 15528-15532
25. Matthias, A., Ohlson, K. E. B., Fredriksson, J. M., Jacobsson, A., Nedergaard, J., y Cannon, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 25073-25081
26. Nicholls, D.G., y Lindberg, O. (1973) *Eur. J. Biochem.* **37**, 523-530
27. Nicholls, D.G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **549**, 1-29
28. Jezek, P., y Garlid, K.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19303-19311
29. Garlid, K.D., Orosz, D.E., Modriansky, M., Vassanelli, M., y Jezek, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2615-2620
30. Rial, E., Poustie, A., y Nicholls, D.G. (1983) *Eur. J. Biochem.* **173**, 197-203
31. Klingenberg, M., y Huang, S.G. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1415**, 271-296
32. Nicholls, D.G. (1976) *Eur. J. Biochem.* **62**, 223-228
33. Rafael, J., Ludolph, H.-J., y Hohorst, H.-J. (1969) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 1121-1131
34. Garlid, K.D., Jaburek, M., y Jezek, P. (1998) *FEBS Lett.* **438**, 10-14
35. Cunningham, S.A., Wiesinger, H., y Nicholls, D.G. (1986) *Eur J Biochem.* **157**, 415-420
36. Lanyi, J.K. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1012-1018
37. Echtay, K.S., Winkler, E., Bienengraeber, M., y Klingenberg, M. (2000) *Biochemistry* **39**, 3311-3317
38. Bienengraeber, M., Echtay, K.S., y Klingenberg, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 3-8
39. Hagen, T., y Lowell, B.B. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 642-648
40. Jimenez-Jimenez, J., Zardoya, R., Ledesma, A., Garcia de Lacoba, M., Zaragoza, P., Gonzalez-

- Barroso, M.M., y Rial, E. (2006) *J. Mol. Biol.* **359**, 1010-1022
41. Ledesma, A., García de Lacoba, M., Arechaga, I., y Rial, E. (2002) *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 473-486
42. Klingenberg, M., y Echtay, K.S. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 128-143
43. Winkler, E., y Klingenberg, M. (1992) *Eur. J. Biochem.* **203**, 295-304
44. Tomás, P., Jiménez-Jiménez, J., Zaragoza, P., Vuligonda, V., Chandraratna, R.A.S., y Rial, E. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1658**, 157-164
45. Rial, E., González-Barroso, M.M., Fleury, C., Iturrizaga, S., Sanchis, D., Jiménez-Jiménez, J., Ricquier, D., Goubern, M., y Bouillaud, F. (1999) *EMBO J.* **18**, 5827-5833
46. Echtay, K.S., Winkler, E., y Klingenberg, M. (2000) *Nature* **408**, 609-613
47. Tomás, P., Ledesma, A., y Rial, E. (2002) *FEBS Lett.* **526**, 63-65
48. Trenker, M., Malli, R., Fertschai, I., Levak-Frank, S., y Graiger, W.F. (2007) *Nature Cell Biol.* **9**, en prensa

Semblanza del Dr. Eduardo Rial



Nació en Zaragoza (España) el 26 de abril de 1959. Estudió Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias de la Universidad del País Vasco, obteniendo la Licenciatura en Grado en 1981. En enero de 1982 inició los trabajos de su Tesis Doctoral en la Universidad de Dundee (Escocia) bajo la dirección del Dr. David G. Nicholls obteniendo el grado de Doctor por la Universidad del País Vasco en 1984. Su estancia en la Universidad de Dundee se prolongó hasta octubre de 1987 fecha en que regresó a la Universidad del País Vasco. En 1988 obtuvo una plaza de Científico Titular en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España) y en 2004 fue promocionado a Investigador Científico. Desde 1989 se encuentra destinado en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC en Madrid donde dirige el grupo de Bioenergética Mitocondrial perteneciente al Departamento de Ciencia de Proteínas.

El Dr. Rial ha trabajado desde 1977 en el área de la bioenergética mitocondrial centrandó sus investigaciones en el control de la eficiencia energética de la fosforilación oxidativa. Sus aportaciones más relevantes se enmarcan en el estudio del mecanismo molecular de transporte y regulación de las proteínas desacoplantes. Asimismo, ha hecho aportaciones significativas sobre el control de la eficiencia energética en *Saccharomyces cerevisiae*. Ha publicado más de 50 trabajos en revistas internacionales que han recibido hasta la fecha más de 1200 citaciones.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

GENÉTICA FORENSE

LA CIENCIA AL SERVICIO DE LA JUSTICIA

José Antonio Lorente Acosta^a, María Lourdes Vega Navarrete^b,
Gisele Olivia Rosas Solares^c

- Departamento de Medicina Legal. Universidad de Granada. Av. Madrid, 11-18012, Granada, España. Teléfonos +34 958 24 9928, fax +34 958 24 6107. E-mail: jllorente@ugr.es.
- Centro de Estudios e Investigaciones Genéticas ANIGEN. Av. Municipio Libre 366 P1, Col. Sta. Cruz Atoyac, Deleg. Benito Juárez. C.P. 03310, México, D.F. E-mail: ceianigen@hotmail.com.
- Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior sin número. Ciudad Universitaria. E-mail: grosas@ifc.unam.mx

Resumen

El análisis de ADN es una herramienta muy poderosa que revolucionó la ciencia forense hasta convertirse en la "nueva forma de la evidencia científica". Varios factores han contribuido a su rápida evolución: sólo se requieren trazas de material biológico, el ADN es más estable en comparación con otros marcadores biológicos tradicionales y es un método muy preciso. La trascendencia social de la tecnología del ADN en la identificación humana, la convierte en el arma más eficaz contra la delincuencia. No existen dos personas con el mismo ADN, a excepción de los gemelos idénticos. Las diferencias en la secuencia del ADN entre los individuos constituye el fundamento científico para identificarlos y establecer la relación de parentesco biológico entre ellos. Las cinco áreas de impacto más importantes de esta especialidad son: la criminalística, las pruebas de paternidad, la identificación de personas desaparecidas, la identificación de individuos en desastres y la historia que combina las aplicaciones anteriores. Esta reciente herramienta, que sienta sus bases en la genética clásica, la bioquímica, la estadística y la biología molecular; comparece ante la justicia como testigo que no miente y jamás se desdice. En este artículo presentamos los antecedentes sobre el análisis del ADN, la genética humana y su aplicación en la resolución de los problemas legales.

Palabras clave: Forense, Huella Genética, Medicina Forense, Tipificación Genética, Medicina Legal, Microsatélite, Paternidad, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Polimorfismos de Longitud, Polimorfismos de Secuencia, Prueba de Paternidad

Abstract

DNA analysis is a powerful tool that has revolutionized forensic science and is now considered as “the new form of scientific evidence”. The use of minute quantities of tissue, the stability of DNA, and the high degree of assay precision, have contributed to DNA typing evolution. The enormous social implications of DNA-based technologies have become the most powerful tool in the fight against crime. Two individuals can never have an identical DNA pattern except identical twins. Differences in DNA sequence between subjects establish scientific basis of this method, ensuring the opportunity to positively estimate biological relationships among them. The main five applications of DNA analysis for human identification are: criminal investigation, paternity testing, missing persons, mass disaster and historical issues. This recent tool for personal identification, which has its roots in classical genetics, biochemistry and molecular biology, has found itself in an unlikely arena, a court of law. In this article we present background information on DNA, human genetics and the application of DNA analysis to legal problems.

Keywords: forensic; DNA fingerprinting; DNA typing, forensic medicine; legal medicine; microsatellite repeats; paternity; polymerase chain reaction; length polymorphism, sequence polymorphism, paternity testing.

Introducción

Toda persona es una combinación única e irreplicable (a excepción de los gemelos univitelinos) del patrimonio genético de sus progenitores y ancestros. El ADN o Ácido desoxirribonucleico, es el responsable de proporcionar la identidad biológica a los individuos, porque posee características moleculares extraordinarias que permiten reconocer a una persona de entre todas las demás que habitan nuestro planeta, lo cual constituye la base para que se le identifique con una certidumbre científica razonable.

Los organismos vivos, que por sus características no pueden permanecer indefinidamente en la Tierra, necesitan preservarse como especies y esto se logra por medio de la reproducción [1]. El diseño de construcción de cada individuo queda delineado desde el instante en el que el ADN contenido en el espermatozoide del padre se une al contenido genético en el óvulo de la madre.

La reproducción humana no da como resultado productos con características idénticas, sino que introduce variabilidad, cambios que responden a las exigencias de un medioambiente con circunstancias nuevas y modificadas para poder sobrevivir. En otras palabras, la naturaleza no concentra riesgos manteniendo los organismos biológicos inmutables, más bien diversifica su inversión introduciendo variedad en el momento mismo de la concepción, concentrada en un compartimento de la célula, unidad fundamental de tamaño microscópico capaz de reproducción independiente y de generar un individuo completo.

Uno de los campos del conocimiento que se ha enriquecido gracias al desarrollo de los métodos de identificación humana molecular es sin duda, la criminalística, que se encarga del estudio del indicio físico y que tiene por objeto la identificación de los involucrados y la reconstrucción del hecho probablemente constitutivo de delito para proporcionar los elementos suficientes al juzgador con el fin de que se imparta justicia.

La utilización del ADN para realizar análisis en el ámbito de la administración de Justicia ha adquirido, en pocos años, una importancia primordial en algunos procesos civiles (demandas de paternidad) y penales, en concreto en aquellos hechos delictivos que pueden dejar vestigios biológicos del autor sobre la víctima, el lugar o los instrumentos del delito, así como de la víctima

sobre el autor o sus pertenencias (delitos violentos, como el homicidio, o contra la libertad sexual de las personas); pero también es un elemento particularmente útil para la identificación de cadáveres (desastres o accidentes). Por tal motivo, ha ido incorporándose firmemente en la práctica forense, dando lugar incluso a una especialidad dentro de la medicina forense: La Genética Forense [2].

La Genética Forense es una especialidad que se basa en el estudio de la transmisión de los caracteres hereditarios y el análisis de la variabilidad genética humana aplicada a la resolución de problemas judiciales. Precisa con alto grado de certeza la relación biológica entre los individuos, como en los casos de parentesco; o bien, entre la evidencia biológica recuperada del lugar de los hechos y el o los probables responsables [3].

Por lo tanto, la Genética Forense estudia materiales biológicos relacionados con:

- a) Acciones u omisiones previstas como delitos en los diferentes códigos penales de nuestro país, entre los que se encuentran aquellos que atentan contra la vida y la integridad corporal, contra la libertad y la seguridad sexual, secuestros, retención y sustracción de menores o incapaces, robos a casa habitación, inseminación artificial no consentida, manipulación genética, clonación y cualquier otro que involucre intercambio o manipulación de material biológico [4-6].
- b) Desaparición de personas [7-9]
- c) Desastres [10-13].
- d) Hechos históricos [14-18].

El lugar de los hechos

El indicio, producido en la comisión de un delito es un elemento fundamental y significativo en la investigación de un hecho criminal porque proporciona, si se analiza adecuadamente, la información necesaria para esclarecerlo.

Cuando dos objetos entran en contacto, habrá un intercambio mutuo de materiales, lo cual constituye la base de la criminalística [19]. Este intercambio se torna más evidente en los hechos violentos, en los que se observa una transferencia dinámica (de sustancias o materiales) entre víctima, victimario y lugar de los hechos, que permiten establecer la participación de cada uno de ellos en tal evento (Fig. 1).



Figura 1. En los hechos delictivos de tipo violento, existe intercambio de materiales entre los protagonistas y el espacio físico en el que se lleva a cabo el delito.

La naturaleza de los materiales intercambiables puede ser variada, pero en la mayoría de los hechos violentos se encuentran los de origen biológico.

La aplicación forense de los métodos de tipificación del ADN durante los últimos quince años, ha representado el mayor avance en la evaluación de indicios o evidencias biológicas. Con su notable sensibilidad y alto poder de discriminación, el análisis del ADN se ha constituido en un apoyo importante en la investigación científica de hechos delictivos en el campo de la actividad pericial [20].

Las ciencias forenses empiezan en el lugar de los hechos (Fig. 2). Si el investigador no puede reconocer el indicio físico, o no lo preserva adecuadamente para el análisis en el laboratorio, ni la tecnología más sofisticada o los expertos más reconocidos podrán resolver el problema. El conocimiento de cómo conducirse apropiadamente en el lugar de los hechos para la búsqueda del indicio físico, aumenta considerablemente la probabilidad de que el material recibido en los laboratorios contenga información que será de utilidad para la investigación [21].



Figura 2. Peritos en la búsqueda de indicios en el lugar de los hechos

El indicio físico incluye cualquier objeto que pueda tener relación con el ilícito que se investiga, puede tener un tamaño muy grande o pueden ser trazas de material microscópico, pero siempre debe manejarse y procesarse de forma que se evite cualquier cambio entre el tiempo en que se recolectó del lugar de los hechos y el tiempo en que se recibe en el laboratorio. Los cambios pueden presentarse por contaminación, ruptura, evaporación, rasgaduras o dobleces; incluso puede llegarse a la pérdida del mismo por un empaqueo impropio o descuido [21].

Es importante que cada indicio se empaque en contenedores separados para prevenir el daño por el contacto entre los objetos, así como la contaminación. Uno de los factores que más daño puede causar a los indicios de naturaleza biológica es la humedad. En este sentido se deben tomar precauciones especiales en su empaqueo, como secarlos en ausencia de sol o embalarlos en contenedores de cartón, para permitir el secado.

Antes de que cualquier indicio de naturaleza biológica sea analizado, debe llevarse al laboratorio. Esto no es tan trivial como suena, las condiciones en las que las moléculas biológicas existen en el cuerpo son muy específicas y se encuentran cuidadosamente controladas. Desde el momento en que el material biológico abandona el cuerpo, su ambiente difiere y se presentan cambios en el mismo. El ADN se encuentra altamente compactado en los cromosomas de las células, si el ADN de cada cromosoma pudiera extenderse, mediría metros de longitud. Fuera de su medio ambiente protector, esta molécula larga y delgada, es muy frágil y puede estar sujeta a degradación. La degradación puede afectar el éxito para obtener resultados en la tipificación, mientras más severa sea la degradación, más pequeños son los fragmentos que se obtienen, y en el mejor de los casos, se obtendrán resultados muy pobres, pero en la mayoría de ellos, no se obtendrán.

Los factores responsables de la degradación del ADN, incluyen el tiempo, la temperatura, la humedad (que facilita el crecimiento de microorganismos), la luz y la exposición a varias sustancias químicas. Todos estos factores se encuentran en el ambiente. Una de las conclusiones importantes de los estudios realizados sobre el efecto de los factores ambientales, es que ninguno de ellos cambiará el ADN de un tipo a otro, más bien, la degradación afecta al ADN de manera que no es posible obtener resultado alguno. Esto significa que no existe posibilidad de tener resultados falsos positivos. En otras palabras, debido a que un perfil no puede cambiar a otro perfil, no existe ningún riesgo de que los factores ambientales cambien el genotipo de una persona de manera que otro individuo que no es el donador de la muestra quede incluido en el estudio. La degradación puede limitar la utilidad de la tipificación del ADN, pero no lo invalida.

El ADN es mucho más estable que los marcadores proteicos convencionales usados en análisis forenses. La mayoría de las proteínas se degradan en un periodo de 2 a 3 meses, el ADN en cambio, aún expuesto al medio ambiente, permanece estable y tipificable por años. Esto es especialmente cierto para los sistemas basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que pueden tolerar una degradación significativa y permanecer útil para proporcionar información. Uno de los objetivos más importantes en la recolección y preservación de indicios biológicos es impedir cualquier proceso degradativo en progreso y limitar al máximo cualquier deterioro futuro de la muestra. En general, los procesos de degradación se retrasan por la remoción de la humedad y la disminución de la temperatura. Por esto, el criminalista o perito de campo debe tener la visión de secar y congelar el indicio tan pronto como le sea posible.

La consideración de la presencia de sustancias extrañas es tan importante como preservar la integridad biológica de un indicio. Este tipo de sustancias puede interferir en el análisis del indicio porque tienen diferentes efectos en la tipificación. Las sustancias no biológicas (colorantes, detergentes u otros químicos) pueden afectar la muestra porque interfieren en los procesos analíticos, lo que conduce a resultados inconclusos o a la falta de ellos.

El material biológico no humano incluye sustancias fisiológicas de otros organismos. Un aspecto particular a considerar es el crecimiento de microorganismos. Los indicios recolectados del lugar de los hechos, tales como sangre o semen, constituyen un medio ambiente fértil para el crecimiento de microorganismos como bacterias y hongos. En su crecimiento, estos microorganismos liberan sustancias que degradan el ADN humano en el indicio y por lo tanto afectan su interpretación.

Con medidas de cuidado apropiadas en la recolección, preservación y manejo del indicio, la contaminación tiende a minimizarse. Una práctica excelente en la recolección del indicio es tomar muestras negativas del área adyacente a la mancha. El propósito de este ejercicio es determinar qué había en el soporte antes de que la mancha se depositara, además de servir como control para los procedimientos de recolección y manejo de indicios.

El riesgo de contaminación también está presente dentro del laboratorio cuando la fuente son otras muestras que se procesan simultáneamente. Aquí es donde el entrenamiento y la participación de analistas calificados, así como el control de calidad del laboratorio juegan un papel muy importante. Deben considerarse medidas de seguridad no sólo para evitar la contaminación entre las muestras, sino también para detectar la contaminación en el momento en que ésta ocurra. Las precauciones incluyen el procesar las muestras problema y las de referencia en tiempos y espacios diferentes, restringir los productos de PCR a cuartos aislados y usar controles para detectar la contaminación de cualquier grupo de muestras que se esté trabajando. El peligro más grande es el cambio de muestras, porque derivará en una tipificación incorrecta, más que no tener resultados.

El objetivo de la búsqueda minuciosa de los indicios es que éstos permiten reconstruir el hecho probablemente constitutivo de delito, reconocer a sus participantes y los medios que se utilizaron para consumir dicho ilícito para presentarlos al juzgador, que se encargará de evaluar la evidencia presentada y tomar una decisión que se traduce en la sentencia del acusado.

Es importante entonces que no existan dudas en los procedimientos o en el manejo de estas evidencias desde su recolección hasta su presentación en el juzgado. La cadena de custodia es la información documentada sobre la ubicación, posesión y manejo de la evidencia desde su recolección hasta la presentación en el juzgado. Las fallas en la cadena de custodia pueden significar serios cuestionamientos sobre la autenticidad e integridad de la evidencia, por lo que cualquier resultado presentado ante el juez tiende a quedar invalidado.

Biología del ADN

En esta sección se hará una descripción de los fundamentos básicos del ADN y su aplicación en el estudio de la Genética Forense.

La Ciencia Forense o Medicina Legal se ha convertido en una especialidad que permite resolver problemas de índole legal, no sólo en los casos criminales, sino también en los casos civiles. Este campo permite la actuación de diversas disciplinas científicas, desde la genética, la biología, la química, las matemáticas, hasta disciplinas como la botánica, la entomología, la balística, el análisis de huellas dactilares, el registro de sonidos y el análisis de la escritura [1].

Durante los últimos 20 años, una herramienta biológica ha revolucionado las investigaciones forenses: el análisis del ADN. Dado que todas las entidades vivas contienen ADN además de presentar diferencias tanto intra como inter especies, todo material biológico relacionado con las cuestiones legales, conlleva información relacionada con su origen o fuente biológica.

Partiendo de indicios tan pequeños como restos de saliva en una colilla de cigarro, cabellos presentes en las ropas o células de la piel, podemos ser capaces de ligar a un sospechoso de un delito con un lugar, determinando el perfil genético obtenido en los indicios encontrados en la escena de los hechos [22]. Una gran cantidad de casos de violación y abuso sexual no resueltos en el pasado, se han podido resolver gracias a la preservación de material genético en hisopos y laminillas que contienen las células sexuales del perpetrador; asimismo, se han podido identificar sin equivocación, víctimas de desastres masivos como los aéreos o terremotos, a través del análisis del ADN de sus restos.

Primero haremos una serie de definiciones relacionadas con el ADN. La unidad básica de la vida es la célula, ésta pequeña fábrica miniatura que produce la materia prima, la energía y la capacidad requerida para sustentar la vida. El ADN contenido en el núcleo celular posee la información necesaria para transmitirla de generación en generación y tiene dos funciones primordiales: hacer copias de sí mismo de manera que las células se puedan dividir y llevar la misma información y contener los elementos para sintetizar las proteínas que realizan todas las funciones que realizan las células (Fig. 3).

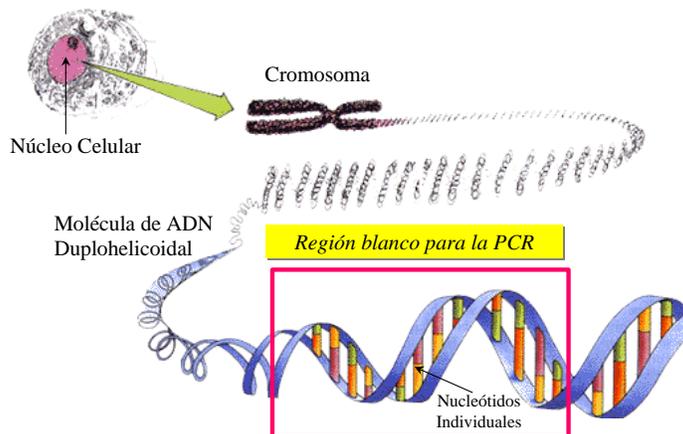


Figura 3. Estructura del ADN en la célula humana

En 1953, Watson y Crick [23] propusieron el modelo de la estructura del ADN como una doble hélice, dispuesta como una escalera de caracol. Los dos lados de la escalera están compuestos por subunidades repetidas de desoxirribosas (azúcar de 5 carbonos) unidas entre sí por un enlace fosfodiéster entre el 5'OH de un azúcar, con el 3'OH del siguiente azúcar. Los "peldaños" están formados por bases nitrogenadas unidas al carbono uno de cada desoxirribosa por un enlace glicosídico y apareadas entre sí, cada par constituido por una base de purina y una base de pirimidina. En el ADN hay cuatro bases: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C), las dos primeras son purinas y las últimas pirimidinas. Una de las características más importantes del ADN es la complementariedad de las bases, es decir la adenina (A) puede aparearse solamente con la timina (T) y la guanina (G) sólo con la citosina (C). Los pares de bases (pb) están unidos por puentes de hidrógeno.

La importancia de los nucleótidos (conformada por la base nitrogenada, la desoxirribosa y el fosfato) radica en el almacenamiento de la información biológica y constituyen los elementos de construcción de los ácidos nucleicos, que son largos polímeros en los que las subunidades de nucleótidos están unidas covalentemente gracias a la formación de un enlace éster entre el grupo hidroxilo 3' del residuo de azúcar de un nucleótido y el grupo fosfato 5' del nucleótido siguiente. Existen dos tipos principales de ácidos nucleicos que se diferencian en el tipo de azúcar de su esqueleto. Los que se basan en la desoxirribosa, se denominan ácidos desoxirribonucleicos, o ADN y contienen las bases A, T, G y C y los que se basan en la ribosa y reciben el nombre de ARN que contienen uracilo (U) en lugar de timina. La secuencia de las bases de un polímero de ADN representa la información genética de la célula viva. La capacidad de las bases de diferentes moléculas de ácidos nucleicos para reconocerse unas a otras mediante interacciones no covalentes (denominadas apareamiento de bases) –G con C y A con T o con U- constituyen la base de toda la herencia y la evolución.

El ADN contiene toda la información necesaria para constituir un individuo completo. Todos los seres vivos tienen como portador de la información genética al ADN y es el mismo en todas las células del individuo, es decir, el ADN de un hombre es el mismo en su sangre, en sus células de la piel, en su semen o en su saliva.

Existen alrededor de tres mil millones de pares de bases en una copia del genoma humano. En los seres humanos el ADN que se encuentra en el núcleo de las células se denomina ADN nuclear y está compactado en cromosomas, que son estructuras muy densas de ADN y proteínas denominadas histonas. El genoma humano consiste de 22 pares de cromosomas autosómicos y dos cromosomas que determinan el sexo. Los masculinos se

designan como XY pues contienen una sola copia del cromosoma X y una del cromosoma Y, mientras que los femeninos contienen dos copias del cromosoma X y se designan como XX. La identificación humana se realiza usando marcadores de los cromosomas autosómicos y el género masculino o femenino, con marcadores de los cromosomas sexuales.

Los cromosomas somáticos (es decir los de las células del cuerpo) se encuentran en estado diploide, contienen dos pares de cada cromosoma, mientras que los de los gametos (espermatozoides y óvulos) se encuentran en estado haploide, es decir contienen una sola copia de cromosomas. Durante la unión de las células sexuales, el cigoto resultante contiene nuevamente sus dos pares de cromosomas y se convierte en diploide.

La gran mayoría de las moléculas de ADN (alrededor del 99.7%) es igual entre los individuos y únicamente el 0.3% del mismo difiere entre los mismos, constituyendo la variabilidad genética que observamos.

El estudio de las variaciones entre los organismos se ha realizado utilizando los denominados polimorfismos genéticos o marcadores moleculares, que son regiones de ADN no codificante que no están sujetas a presión de selección y por lo tanto permite amplios niveles de variación, convirtiéndose en regiones de interés para la identificación humana.

El análisis detallado del genoma humano ha permitido identificar diversas categorías de secuencias de ADN no funcional, muchas de ellas son formas de ADN repetitivo [24] el cual puede estar altamente, moderadamente o poco repetido. Éstos a su vez se clasifican de acuerdo a su disposición a lo largo del genoma o al tamaño de la unidad de repetición en dos grupos: 1) ADN Repetido en Tándem que son regiones del ADN con una secuencia común repetida de manera continua en un fragmento de ADN y constituyen el 10% del genoma y según la unidad de repetición se subdivide en tres tipos: ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsatélite y 2) ADN Repetitivo Disperso que constituye del 15-20% del genoma y consiste de secuencias de repeticiones intercaladas individualmente en forma de unidades sencillas que se distribuyen por diversos puntos del genoma y se divide en dos familias denominadas SINE (elementos intercalados cortos, formados por menos de 500 pb) y LINE (elementos intercalados largos, compuestos por más de 500 pb) y que derivan de unos fragmentos de ADN transponibles que se han multiplicado hasta dar lugar a un cierto número de copias en nuestro genoma

Los diferentes tipos de ADN Repetitivo en Tándem tienen un patrón de distribución cromosómica diferente: el ADN satélite tiene una localización centromérica, el ADN minisatélite está en los telómeros o sus proximidades y el ADN microsatélite se encuentra disperso en el cromosoma.

Las secuencias repetidas de ADN satélite se disponen en bloques de unidades de longitud variable que van desde 100 kb hasta varios Mb, no se transcriben y su compleja organización no las hace adecuadas para el análisis forense. El ADN satélite se separa del ADN genómico por centrifugación en gradiente de densidad con plata-sulfato de cesio de acuerdo a su contenido de GC, representa del 2 al 6% del genoma y tiene una secuencia consenso (unidad básica de repetición) de 5 - 170pb.

Las secuencias repetidas denominadas ADN minisatélite son de menor tamaño y fueron descritas por Jeffreys en 1985 [4], quien reportó la presencia de secuencias de 0.1 a 40 kb con una unidad de repetición de 10-100 pb. Poseen un alto grado de variabilidad tanto en el número de repeticiones en tándem como en la secuencia de la unidad de repetición. Nakamura y cols., denominaron a estas secuencias VNTR's (*Variable Number of Tandem Repeats*) [25]. En el genoma humano estas secuencias se encuentran en las regiones subterminales de los cromosomas y están implicadas en fenómenos de recombinación.

Una categoría importante de ADN repetitivo es el ADN microsatélite, formado por secuencias pequeñas de hasta 400 pb que las hace ideales para el análisis por PCR. Estas secuencias también denominadas STR's (*Short Tandem Repeats*) tienen una unidad de repetición que va entre 2 y 7 pb [26] y se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma [27]. Con base en la longitud, el número de repeticiones y la variabilidad que presentan estas secuencias, se les ha denominado STRs simples, complejos y compuestos o STRs con baja, intermedia y alta microvariabilidad [28].

Como se ya se explicó, el ADN Repetitivo Disperso está representado por secuencias que se diferencian en el número de nucleótidos que constituyen la unidad de repetición. Dos familias componen este tipo de ADN, la familia SINE y la familia LINE.

La familia SINE (*Short Interspersed Nuclear Elements*) consiste de repeticiones menores de 500 pb y también se le denomina *Alu*, por la presencia de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Alu* I. Estas secuencias son las más abundantes en el genoma humano y tienen una secuencia muy conservada de 300 pb rica en GC localizada en las regiones cromosómicas más activas a nivel transcripcional en las bandas R (de replicación precoz) de los cromosomas

La familia LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements*) consiste por su parte de secuencias repetitivas mayores de 500 pb. La familia LINE-1, L1 o *Kpn* es la más abundante en humanos. Al igual que la familia *Alu*, se localizan en la eucromatina pero a nivel de las bandas G (de replicación tardía) de los cromosomas.

Como se mencionó anteriormente, las secuencias de ADN no codificante, al no estar sujetas a una fuerte presión de selección, permiten grandes niveles de variabilidad genética sin que se produzcan alteraciones fenotípicas importantes. Esta característica ha convertido a este ADN en la mayor fuente de investigación de polimorfismos en Genética Forense.

Los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base, hasta cambios en el número y tamaño de las unidades de repetición y son de dos tipos:

Polimorfismos de secuencia. Se producen por el cambio de uno (mutación puntual) o más nucleótidos en una secuencia de ADN y se presentan en el ADN codificante.

Polimorfismos de Longitud. Se presentan por la inserción o delección de uno o más nucleótidos, es el más abundante del ADN repetitivo mini y microsatélite.

¿Cómo analizamos los polimorfismos en Genética Forense?

La tecnología de ADN ha permitido el estudio de la variabilidad humana desde hace más de una década mediante el análisis directo del material genético. El primer paso en la identificación humana fue realizado por Jeffreys y cols.[4], quienes describieron un *locus* polimórfico con un número de fragmentos de restricción de longitud variable.

Los primeros polimorfismos en utilizarse fueron los RFLPs, polimorfismos de ADN minisatélite basados en la longitud de los fragmentos de restricción [4], los cuales se identificaron mediante la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción y su posterior hibridación con sondas.

Inicialmente se usaron sondas multilocus (MLPs) que detectan múltiples *loci* minisatélites bajo condiciones poco rigurosas de hibridación generando patrones complejos de bandas que corresponden a distintos *loci* con secuencias relacionadas entre sí y que serían específicos de cada individuo, a los que Jeffreys y cols. denominaron "Huellas genéticas" ("*DNA fingerprints*") [4].

Posteriormente Wong y cols [29] y Nakamura y cols en 1987 [25] introdujeron el uso de sondas unilocus (SLPs o *Single Locus Probes*) que proporcionan una o dos bandas según el carácter homocigoto o heterocigoto del individuo para ese *locus*, obteniendo un perfil unilocus de ADN (*DNA profiling*).

En la última década las sondas unilocus utilizadas para la investigación forense han sido bien caracterizadas y ampliamente usadas aunque existen limitaciones para su empleo. Las mayores limitaciones para su empleo son tanto la integridad del ADN problema, como su cantidad; aunado a esto está la laboriosidad del método, el tiempo de análisis y la estandarización de la técnica.

Muchas de estas dificultades pudieron contrarrestarse por el advenimiento de la técnica del PCR descrita por Mullis y Faloona en 1987 [30] y por Saiki y cols en 1988 [31]. En el estudio de la genética Forense el análisis por PCR ha permitido estudiar material poco abundante y aún degradado (Fig. 4). Además ésta técnica es rápida, de fácil interpretación, muy sensible y altamente específica.

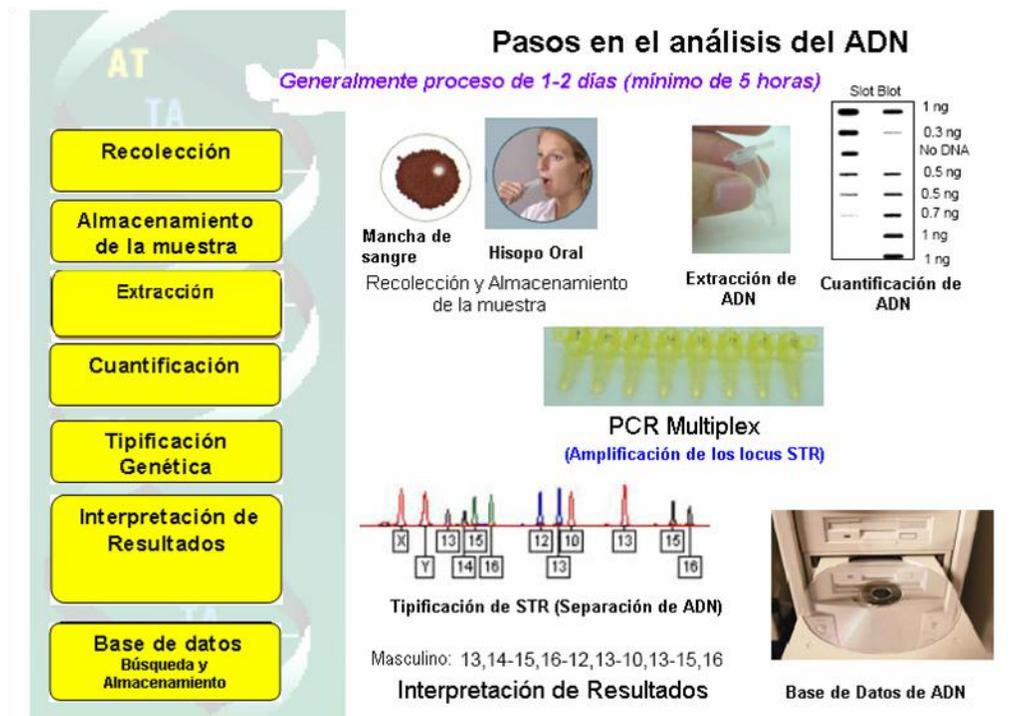


Figura. 4. Análisis de ADN en la identificación humana. (Tomado y modificado de la presentación del Dr. John Butler: A primer on DNA profiling using STR Markers. En 1st International Web Conference on Human Identification.)

El PCR es una técnica de amplificación *in vitro* que nos permite sintetizar millones de copias idénticas de una secuencia única de ADN. Esta técnica se basa en la facilidad que tiene la molécula de ADN para desnaturalizarse y renaturalizarse. La síntesis de ADN se inicia utilizando secuencias específicas de 20 a 30 nucleótidos complementarias al fragmento que se desea amplificar en combinación de una ADN polimerasa termoestable que incorpora los nucleótidos. La reacción se lleva a cabo en un termociclador que realiza la separación, el acoplamiento y la síntesis de la cadena de ADN logrando un aumento exponencial de los fragmentos de ADN de interés.

En la medicina legal el PCR ha enriquecido enormemente el análisis de la identificación de individuos a través de la tipificación de regiones cromosómicas con secuencias de ADN altamente variables o polimórficas.

Como ya se mencionó, los *loci* STR (*short tandem repeat*) son secuencias repetitivas pequeñas de 3 a 7 pb que se encuentran bien distribuidas a lo largo del genoma y son una fuente rica de marcadores polimórficos que pueden detectarse aplicando el PCR. Los alelos de los *loci* STR pueden diferenciarse por el número de copias de la secuencia repetida presente en la región amplificada y se distinguen de otros utilizando detección radiactiva, o fluorescente después de la separación electroforética (Fig. 5).

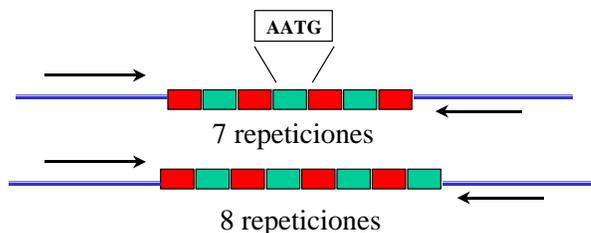


Figura 5. Repeticiones cortas en tandem (STRs) que indican una condición heterocigótica (7 u 8 repeticiones) en el *locus* analizado.

El ADN puede ser la prueba determinante para establecer la identidad de una persona, por lo que varias compañías han desarrollado y comercializado sistemas integrados de productos que permiten que el análisis de ADN sea exacto, rentable y relativamente menos complicado. Los sistemas o estuches de marcaje (*kits*) usados se aplican para la investigación de casos criminales, identificación de personas extraviadas, filiación genética de militares, víctimas de desastres en masa y pruebas de paternidad.

Aun las muestras que contienen pequeñas cantidades de ADN pueden proporcionar información útil, debido a que se utilizan reactivos que amplifican regiones cortas repetidas en tándem de ADN, estas regiones son altamente polimórficas y la probabilidad de obtener el mismo resultado en dos individuos diferentes es de 1 en 82 000 millones.

Diferentes laboratorios han desarrollado *kits* basados en el análisis de STRs con marcadores fluorescentes los cuales tienen un alto poder de discriminación para la identificación humana. El desarrollo de estos marcadores genéticos, ha permitido también el desarrollo de bases de datos cada vez más completas. Estos sistemas son detectados por el uso de sistemas automatizados de electroforesis capilar de múltiples canales que detectan los productos de PCR marcados fluorescentemente.

Uno de estos sistemas, que muestra el más alto poder de resolución, amplifica simultáneamente 15 *loci* más el marcador de amelogenina (gene que posee regiones en los que se pueden identificar tanto el cromosoma X como el cromosoma Y) [32] determinando el sexo en una sola amplificación (Fig. 6).

Posterior a la amplificación, el colorante fluorescente es unido a un producto de PCR que se incorpora en la región de ADN amplificada. Estos alelos STR's amplificados son visualizados como bandas en un gel o representados por picos en un electroferograma. (Fig. 7)

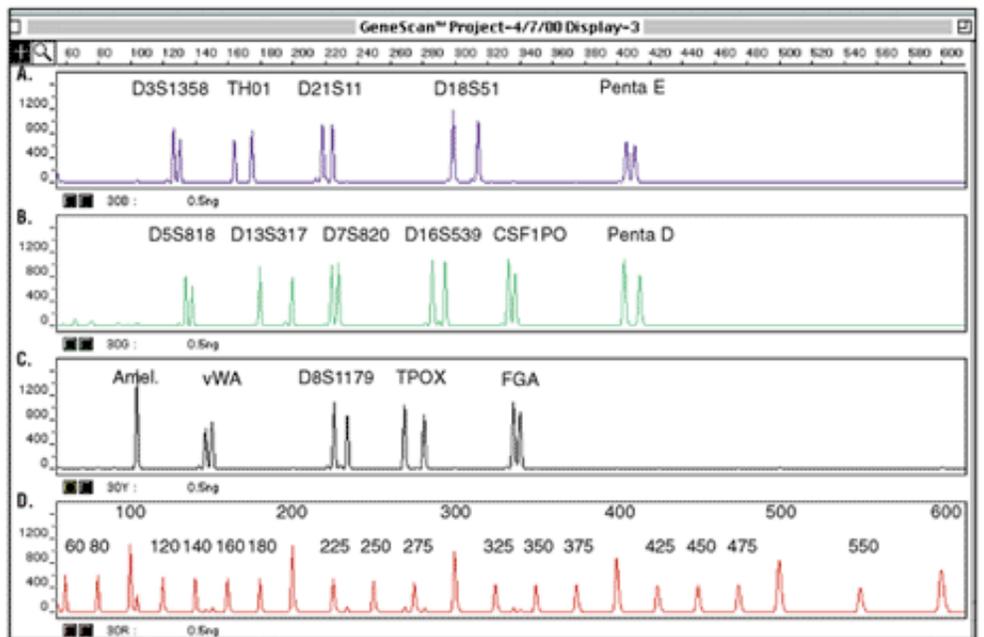


Figura 6. Amplicones obtenidos de 16 *loci* a partir de una muestra femenina mediante la aplicación de PowerPlex16 System (Promega)

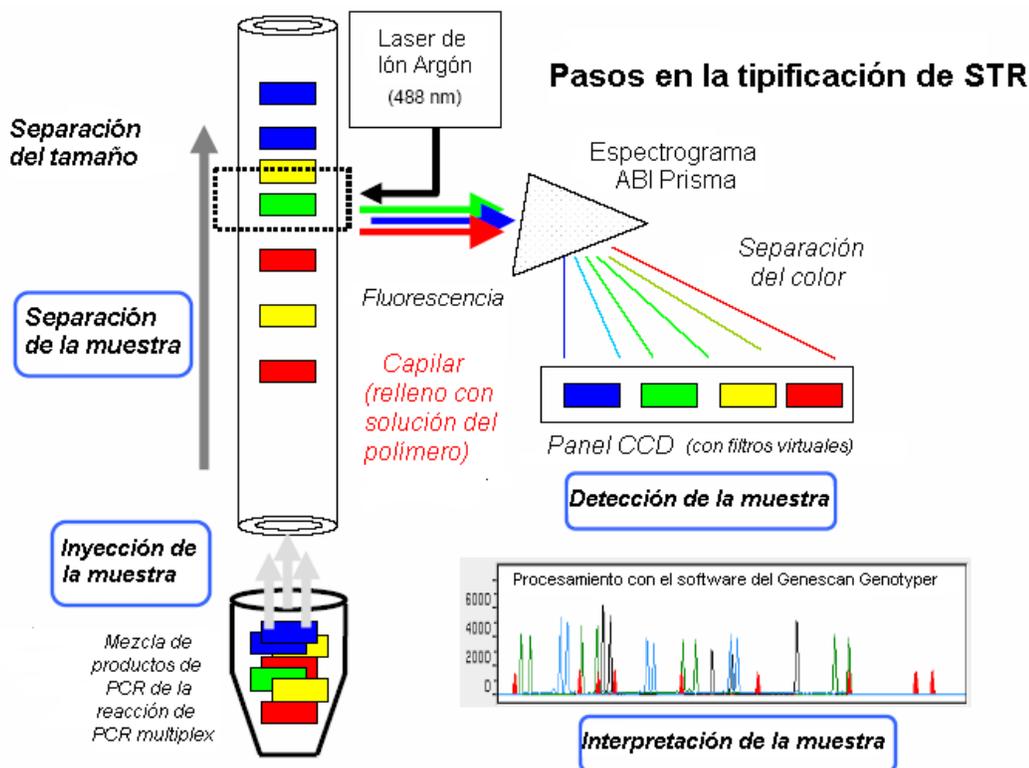
Cada uno de los colores representa un grupo de STRs marcados con diferentes colorantes fluorescentes: azul para los STRs marcados con el fluoróforo 5-FAM (5-carboxifluoresceína); verde para el VIC; amarillo para el NED; rojo para PET y naranja para el LIZ). Los últimos cuatro pertenecientes a la compañía Applied Biosystems. En el proceso se separan los colores en diferentes componentes espectrales. Cada uno de estos colores fluorescentes emite su máxima fluorescencia a diferente longitud de onda. Durante la colección de los datos en el secuenciador, las señales fluorescentes se separan por un gradiente de difracción acorde con sus longitudes de onda: azul, verde, amarillo y rojo.

En la actualidad ha habido un gran despliegue de tecnología encaminada al análisis de los STRs entre las que se mencionarán algunas de las más revolucionarias:

PCR en tiempo real (LightCycler). Permite realizar al mismo tiempo la amplificación de un fragmento de ADN y su detección por fluorescencia en tiempo real. Esta metodología además de su gran especificidad, permite cuantificar el producto de la reacción y detectar posibles mutaciones en la secuencia.

Microarreglos de ADN o microchips. Son sistemas de hibridación y detección con sondas específicas que permite el análisis de cientos de miles de secuencias alelo específicas, en donde el fragmento de ADN problema, al hibridar específicamente con su secuencia complementaria, detecta una señal fluorescente que es analizada en un sistema automatizado.

Espectrometría de masas. Analiza una secuencia en segundos sin utilizar marcador alélico (que consiste en una mezcla de los alelos comunes presentes en la población humana para un marcador STR particular). La limitante es que sólo se pueden utilizar fragmentos de ADN menores a 100 pb. En esta metodología se puede determinar el peso molecular del producto de ADN.



Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing, 2nd Edition*, Figure 13.8. © Elsevier Science/Academic Press

Figura 7. Pasos en la detección de los STRs en la identificación humana. (Tomado de la presentación del Dr. John Butler: A Primer on DNA profiling using STR Markers. En 1st International Web Conference on Human Identification.)

Pruebas de paternidad

La curiosidad por la forma en que se transmiten la vida y los rasgos familiares ha acompañado siempre al ser humano. Intuitivamente se ha considerado la sangre como un elemento básico de identidad y vehículo de unión paterno filial, sintetizándose esta creencia en frases como “llevar la misma sangre”, “ser hermanos de sangre”, etc., aunque tuvieron que transcurrir muchos siglos para que la ciencia pudiera informar con conocimiento de causa sobre esa realidad [2].

Además de la aplicación del análisis del ADN en la identificación humana, su uso se extiende a los estudios de parentesco. Cuando es importante conocer quién es el padre en los delitos de índole sexual para de esta forma detener al responsable, o en la búsqueda de personas desaparecidas e investigaciones de desastres que incluyen análisis reverso de parentesco, así como en los asuntos de inmigración; el análisis del ADN se convierte en una de las herramientas más importantes para resolver estos casos, que antes se consideraban complicados.

Gracias a la forma predecible con que el DNA se segrega a la descendencia, es fácil excluir la relación de parentesco entre muestras problema (provenientes de restos óseos, de cualquier otro tejido o fluido de cadáveres o personas sometidas a prueba) y muestras de referencia.

Cuando no es posible excluir el parentesco, se aplican cálculos estadísticos que incluyen la distribución de frecuencias de los alelos involucrados en la población a la que pertenecen los individuos sometidos a estudio, en una ecuación denominada Índice de verosimilitud (*Likelihood ratio*), que básicamente pone a prueba dos hipótesis mutuamente excluyentes: ¿Qué tan probable es que una evidencia de ADN, provenga de personas con una relación de parentesco específica?, o ¿Qué tan probable es que la misma evidencia de ADN provenga de dos personas no relacionadas?. Las mismas consideraciones de exclusión e inclusión de parentesco se emplean en los casos de paternidad de orden civil.

La Suprema Corte de Justicia de la Nación (SCJN) emitió un criterio para todo el país en el que se establece que quienes se nieguen a realizar la prueba genética de ADN, solicitada durante un juicio, automáticamente estarán aceptando la paternidad que se les atribuye.

La Corte se había pronunciado de manera parcial sobre estos temas en diversos casos, pero en esta ocasión emitió una tesis jurisprudencial que será obligatoria para todos los jueces del país. Los ministros de la SCJN, determinaron que en los juicios de paternidad "puede negarse el presunto ascendiente a la práctica y desahogo de la prueba pericial de ADN", pues tiene el derecho a decidir sobre su integridad. Pero, la Corte concluyó que "ante la negativa del presunto ascendiente a practicarse la mencionada prueba, debe operar la presunción de la paternidad, salvo prueba en contrario".

Los ministros que votaron en favor de esta decisión lo hicieron porque estimaron que una decisión en el sentido opuesto "llevaría a dejar el interés superior del niño a merced de la voluntad del presunto progenitor y no se respetaría su derecho fundamental a conocer su identidad" [33].

Marcadores de linaje

Los marcadores de linaje, como el cromosoma "Y" y los marcadores de ADN mitocondrial, son segregados de generación en generación sin cambios (excepto en el caso de mutaciones). Los marcadores de linaje materno se pueden identificar con la información contenida en el ADN mitocondrial, mientras que los de linaje paterno se identifican con los marcadores del cromosoma Y. Con los marcadores de linaje, la información genética de cada marcador se denomina *haplotipo*, en lugar de genotipo debido a que sólo hay un solo alelo por individuo.

Polimorfismos del cromosoma Y. El cromosoma Y es el más corto de los cromosomas humanos. Se diferencia del resto de los cromosomas en que su herencia es exclusivamente paterna, es decir, se transmite de padres a hijos varones sin posibilidad de recombinación. Por lo tanto, la información genética contenida en el mismo se hereda como haplotipo: los genotipos para cada uno de los marcadores del cromosoma Y se transmiten en bloque y no de forma independiente. De esta forma, todos los individuos emparentados por vía paterna comparten el mismo haplotipo para el cromosoma Y, excepto cuando hay mutaciones [34,35].

El cromosoma Y contiene muchos polimorfismos, presenta muchos STRs y de muy diferentes tipos: diméricos, triméricos, tetaméricos, etc. Varios estudios han demostrado que los polimorfismos del cromosoma Y son los más apropiados para las muestras forenses por ser los más variables y de corta longitud (Tabla 1) [36,37,38].

Tabla 1. Áreas de aplicación del análisis del cromosoma Y.

Uso	Ventaja
Casos forenses en evidencias de asaltos sexuales.	Amplificación específica del componente masculino (se puede evitar la amplificación diferencial para separar los espermatozoides de las células epiteliales).
Pruebas de paternidad	Puede realizarse la prueba con niños varones en ausencia de la madre.
Investigación de personas desaparecidas	Se pueden analizar parientes varones de la misma línea paterna como muestras de referencia.
Migración humana y estudios evolutivos.	La ausencia de recombinaciones posibilita la comparación de individuos varones separados por largos periodos.
Investigación histórica y genealógica	Los apellidos se conservan generalmente por los varones, es posible establecer relaciones cuando las pruebas documentales se encuentran limitadas.

Traducido de Recents Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis [39].

Existen alrededor de 219 STRs útiles en el cromosoma Y, pero sólo un grupo de 12 o 15 se tipifican comúnmente (Fig. 8). Es conveniente resaltar que debido a la naturaleza de su segregación (patrilineal), los haplotipos obtenidos no son específicos para cada persona, dado que todos los varones que comparten el linaje paterno tendrán el mismo haplotipo, salvo si se presenta un evento de mutación en alguno de los que comparten la línea paterna. Si excluimos los eventos de mutación, todos los parientes (hermanos, padre, hijos, tíos paternos, etc.) de un probable responsable compartirán su haplotipo Y, consideración muy importante que debe tomarse en cuenta cuando se calcula la fuerza de la evidencia [39].

Desventajas en el análisis del cromosoma Y. Los principales problemas derivan de las características hereditarias del cromosoma Y.

1. No es único de cada persona, sino que es común para todas las pertenecientes a un mismo linaje paterno, incluso regresándose a generaciones anteriores (abuelos, bisabuelos, etc.), de modo que estadísticamente no tiene tanto valor como el ADN autosómico, único de cada persona.
2. Sólo se puede aplicar a los hombres, de modo que en un estudio de paternidad, por ejemplo, no sirve para determinar si un hombre es el padre de una mujer [1].

Polimorfismos del ADN mitocondrial (ADNmt). En las células femeninas existe una pareja de cromosomas X que se pueden recombinar entre sí al igual que los cromosomas autosómicos, hablando en términos de herencia. Sin embargo, los varones transmiten a su descendencia femenina todos los marcadores localizados en su cromosoma X en bloque, o sea, uno de los cromosomas X de cada mujer es idéntico al de su padre. Esto proporciona una herramienta útil en los casos de paternidad con descendencia femenina o en estudios de filiación o identificación en los que el presunto padre no está disponible y se debe recurrir a familiares en primer o segundo grado [40,41,42].

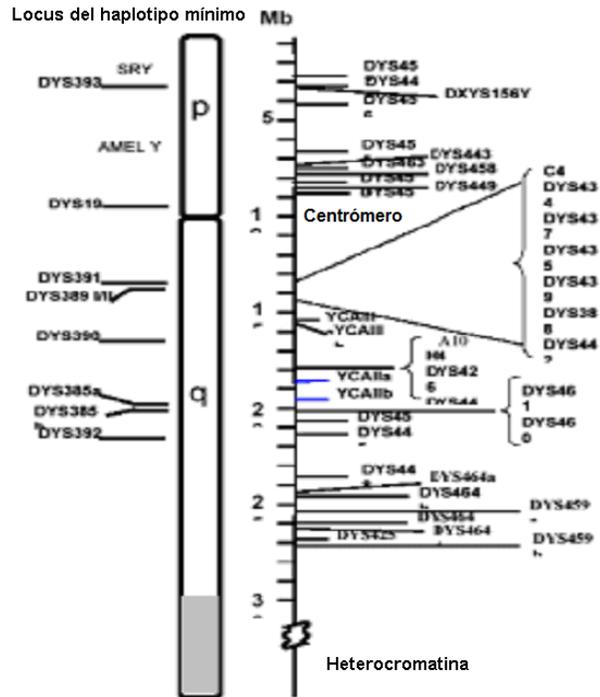


Figura 8. Localización cromosómica de los marcadores Y STRs comúnmente utilizados (DYS391I y II, DYS389, DYS439, DYS438, DYS437, DYS19, DYS392, DYS393, DYS390, DYS385a y b). No se utilizan todas las regiones, a lo sumo sólo 12. Todos los STRs que se estudian empiezan con DYS. [39].

Todo el patrimonio genético que poseemos los seres vivos se encuentra confinado en dos organelos celulares: el núcleo y la mitocondria, dando nombre al ADN: ADN nuclear (ADNn) y ADN mitocondrial (ADNmt). Las mitocondrias poseen su propio ADN dispuesto circularmente y cerrado y se encuentra en múltiples copias en la célula (1000 a 10000 copias).

Dentro de las características que hacen al ADN mitocondrial una herramienta útil para el laboratorio forense se encuentran:

- 1) El número de copias presente por célula, que permite que ante muestras degradadas o con escasa o nula cantidad de ADN nuclear y por simple probabilidad, siempre puedan presentarse moléculas de ADNmt íntegras que puedan ser analizadas. Sus características estructurales como su disposición circular y su pequeño tamaño (16.5 Kb), lo hacen también menos vulnerable a la acción de nucleasas [43,44].
- 2) El ADNmt es más compacto, conteniendo secuencias para 2 RNAs ribosómicos, 22 RNAs de transferencia, 13 proteínas y una región no codificante de aproximadamente 1,100 pb, llamada asa de desplazamiento (*d-loop*) o región control que no se recombina (Fig. 9) [45,46].
- 3) La ubicación de la molécula de ADNmt en una zona cercana a la membrana interna de la mitocondria, en donde se encuentra expuesta a la acción de los radicales libres generados durante la fosforilación oxidativa, tiene un efecto mutagénico. Por otro lado al no poseer histonas queda más expuesto a dicha acción mutagénica. Todo lo anterior tiene como resultado un ADN con índices de mutación 5 a 10 veces superiores al del ADN nuclear. Esta gran variabilidad es una propiedad muy importante en el aspecto forense por sus implicaciones de poder discriminar entre individuos.

- a) Pelos sin bulbo, vestigio muy común en la pericia forense y que de hecho es posible obtener resultados a partir de una muestra tan pequeña como 1-2 cm de pelo carente de raíz.
- b) Restos óseos antiguos, la estructura circular de la molécula de ADNmt hace que sea menos susceptible a la degradación por la exonucleasa.
- c) Restos de personas desaparecidas, donde familiares relacionados por vía materna (incluso ascendientes o descendientes separados por alguna generación) pueden suministrar muestras de referencia que puedan compararse y verificar la identidad de los restos analizados.

Procedimiento analítico. El análisis del ADNmt es uno de los análisis forenses más costosos, no sólo desde el punto de vista económico, sino por el tiempo y el esfuerzo empleado, ya que se aplican una gran cantidad de técnicas de biología molecular para obtener un resultado único y porque las muestras suelen ser degradadas y/o mínimas, requiriendo muchas reacciones y procedimientos de control. El esquema básico del procedimiento se muestra en la Fig. 11:

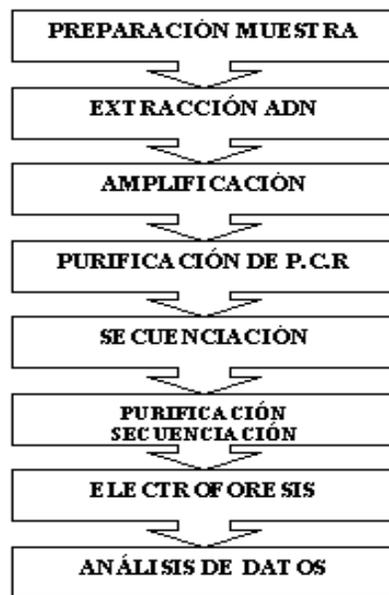


Figura 11. Procedimiento analítico en ADNmt. Tomado de [47].

El análisis del ADNmt también presenta una serie de limitaciones: Su análisis es mucho más sensible a la acción de contaminaciones. La incorporación accidental de una sola célula aportando ADN exógeno al propio de la evidencia, supone la adición de miles de copias de ADNmt y por tanto, la aparición de resultados erróneos [47].

A pesar de que el ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna, en ocasiones se presentan individuos en los que coexisten más de un tipo de ADNmt, fenómeno conocido como heteroplasmia [48]. Estas pueden ser de dos tipos, de secuencia y de longitud. Estas pueden complicar la interpretación y los resultados posteriores.

Aunque el análisis del ADNmt es una prueba eficiente en el caso de exclusiones, si se detectan coincidencias entre las muestras, es imprescindible realizar un tratamiento estadístico, realizando comparaciones con las bases de datos poblacionales existentes y determinando el

número de secuencias idénticas a las de la muestra problema que hayan sido detectadas en dichas bases de datos. Desafortunadamente las bases de datos para el ADNmt son escasas por lo que el poder de discriminación es bajo también.

La molécula de ADNmt ha sido de gran ayuda para los antropólogos moleculares, pues a través de ella se ha aprendido más sobre filogenia y evolución [49]. Se ha utilizado también para establecer el linaje de todos los humanos en África hace 20,000 años, para estudiar animales extinguidos [50] y para el estudio de otros restos antiguos como huesos humanos de 5500 años de antigüedad [51].

Bases de datos.

No existen dos personas con huellas dactilares idénticas y este hecho es de invaluable utilidad en la identificación de delincuentes. De la misma forma, no existen dos personas, a excepción de los gemelos idénticos, que tengan la misma secuencia de pares de bases en su ADN y, por lo tanto, el análisis del ADN tiene idéntico potencial para identificar al de las huellas dactilares [52].

El uso del análisis de ADN en apoyo a la investigación del crimen, ha sido el avance más significativo en las ciencias forenses desde la aplicación de las huellas dactilares en el siglo XIX, y ha sido descrito recientemente como “la herramienta de lucha contra el crimen del siglo XXI” por el Servicio de Ciencia Forense (FSS) de Inglaterra y Gales. El ADN del material biológico obtenido del lugar de los hechos y de probables responsables y la búsqueda de éstos entre una colección de perfiles genéticos en las bases de datos de la policía, se ha convertido rápidamente en una actividad de rutina en la práctica forense en muchas jurisdicciones criminales de todo el mundo [53].

Muchos de los delitos que quedan sin resolver porque en un momento determinado no hay un sospechoso, pueden ser resueltos con posterioridad, incluso años después de que se hayan cometido, gracias al desarrollo de las bases de datos. Las mismas pretenden colaborar en la resolución de casos criminales permitiendo a las fuerzas investigadoras la comparación automatizada de perfiles de ADN provenientes de diversas fuentes: indicios no identificados del lugar de los hechos, muestras de referencias de probables responsables o convictos y muestras de referencia de las víctimas.

Cuando la búsqueda en las bases de datos relaciona a un probable responsable con indicios (por ende, con el delito), aparece lo que se denomina *cold hit* o “identificación inesperada”. Del mismo modo se puede encontrar que una serie de violaciones de índole sexual se hayan cometido por la misma persona, porque el ADN del esperma coincide en todos los casos, pese a que no se tenga al probable responsable [1].

Antes de la implementación de ampliaciones basadas en el método de PCR en los 90s, la aplicación inicial de la “huella dactilar del ADN” (basada en pruebas mono y multilocus) estuvo confinada primordialmente a resolver asuntos forenses. En esta modalidad de aplicación, los laboratorios comparaban directamente los perfiles genéticos obtenidos del material biológico recuperado del lugar de los hechos con aquellos perfiles de individuos involucrados en un delito en particular bajo investigación. Sin embargo, la subsiguiente capacidad de construir representaciones digitales de perfiles y su almacenamiento en bases de datos computarizadas que permiten la búsqueda continua de información ha hecho posible que el papel del análisis de ADN se amplíe considerablemente en la confronta de muchas investigaciones criminales [54].

Adicionalmente, una gran cantidad de laboratorios cuentan con mejores técnicas de extracción de una gran cantidad de tipos de evidencias que se encuentran en condiciones de escasa cantidad y baja calidad, lo que deriva en la obtención de perfiles genéticos relacionados

con un gran número de delitos. Algunas veces tales métodos pueden ser exitosos cuando otras formas de evidencias forenses han probado ser insuficientes o no confiables en conseguir que los delincuentes sean presentados ante la justicia por delitos cometidos algunos años atrás.

Los beneficios de esta tecnología consisten en el potencial de realizar identificaciones rápidas y robustas de probables responsables a través de comparaciones automatizadas en bases de datos criminales centralizadas, la capacidad de eliminar de manera confiable personas inocentes de las investigaciones, el incremento de la verosimilitud para generar evidencia fiable y persuasiva para presentar al juez, la reducción en el costo de muchas investigaciones, la probabilidad disuasoria de la base de datos de ADN sobre delincuentes potenciales y un posible incremento de la confianza pública en el proceso judicial.

Dentro de los aspectos a considerar en la creación de una base de datos de ADN se encuentran:

- a) Tipo de personas consideradas para la inclusión: Probables responsables, procesados, sentenciados.
- b) Tipo de delitos: Robos, homicidios, ataques contra la libertad sexual.
- c) Tiempo de permanencia de los datos en la base: Mientras viva el donante, mientras permanezca en la cárcel, mientras prescriba el delito o hasta que la persona cumpla una edad determinada.
- d) Gestión de la base de datos: Es imprescindible que el acceso al equipo informático sea totalmente restringido, sólo personas autorizadas con claves específicas y en momentos limitados deberían consultar y actualizar las bases, que además debe contar con un historial de movimientos en la misma.
- e) Almacenamiento de indicios y muestras de referencia: Destruirlas o guardarlas terminado el proceso legal.
- f) Datos técnicos y operativos: La calidad y la perfección dependen de múltiples circunstancias que se resumen en disponer de los medios y el personal adecuados [1].

En México, no existe ley que contemple la creación y mantenimiento de las bases de datos de ADN, por lo que gran parte del potencial de esta herramienta de identificación se está desaprovechando. Si bien es cierto que se requiere una buena inversión de recursos, también es cierto que la generación de la base de datos es obligada si se desea combatir a la delincuencia, ya que muchos de los delitos sin resolver podrán esclarecerse con prontitud por la comparación automatizada de un perfil genético con múltiples hechos probablemente constitutivos de delito, facilitando las investigaciones ministeriales.

La Genética y la Ley

La Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, en el artículo 21, establece que *“La imposición de penas es propia y exclusiva de la autoridad judicial. La investigación y persecución de los delitos incumbe al Ministerio Público, el cual se auxiliará con un policía que estará bajo su autoridad y mando inmediato”* [55].

Es evidente en este artículo la ausencia de la participación del perito, como la persona que, poseyendo determinados conocimientos científicos, artísticos, técnicos o prácticos, interviene en la investigación ministerial aportando elementos trascendentales que determinan la robustez de una línea de investigación.

El artículo 20, fracción V de nuestra Constitución, brinda al inculpado la garantía de que *“Se le recibirán los testigos y demás pruebas que ofrezca, concediéndosele el tiempo que la ley estime necesario al efecto y auxiliándosele para obtener la comparecencia de las personas cuyo testimonio solicite”* [55]

Vale la pena señalar que la actividad pericial aparece contemplada en el código de procedimientos penales para el D.F., capítulo IV, artículo 135 [56], en el que se decreta que la ley reconoce como medios de prueba:

- I. *La confesión.*
- II. *Los documentos públicos y los privados.*
- III. *Los dictámenes de peritos.*
- IV. *La inspección ministerial y la judicial.*
- V. *La declaración de testigos.*
- VI. *Las presunciones.*

Y añade que también se aceptan como prueba, aquellos elementos aportados por los descubrimientos de la ciencia.

En general, siempre que para el examen de alguna persona o de algún objeto se requieran conocimientos especiales, se procederá con la intervención de peritos. Cada una de las partes tendrá derecho a nombrar hasta dos peritos, a los que se les hará saber por el juez su nombramiento y a quienes se les ministrarán todos los datos que fuesen necesarios para que emitan su opinión [56].

Para ser perito se requiere tener título oficial en la ciencia o arte a que se refiere el punto sobre el cual deben dictaminar, si la profesión o arte están legalmente reglamentadas; en caso contrario o cuando no hubiere titulados, el juez nombrará a personas prácticas [56].

En México se carecen de programas académicos que permitan la obtención de título en Genética Forense, lo que ha permitido que en el ejercicio de esta función pericial existan profesionistas de los más variados perfiles como biólogos, químicos y médicos, con diferentes niveles de comprensión de las áreas de manejo indispensable como son la genética, la bioquímica, la estadística y la biología molecular, entre otras.

Los especialistas de cada una de las partes no necesariamente deben coincidir en sus resultados, por lo que siempre que los peritos nombrados discordaren entre sí, el juez los citará a una junta, en las que se decidirán los puntos de diferencia. Si al final de esta reunión, las discrepancias no se resolvieran, el juez nombra a otro perito conocido como tercero en discordia [56], quien se encargará de analizar exhaustivamente los estudios de cada una de las partes resolviendo en favor de uno de ellos o incluso de ninguno, si detecta deficiencias que inciden de manera potencial en el resultado del estudio. Dado que en el conjunto de opiniones de expertos de la misma especialidad, el tercero en discordia tiene la última palabra, es de esperarse que éste cuente con la mayor experiencia, rigurosidad científica, nivel académico, actualización y probada ética profesional.

Un solo tipo de peritaje no hace prueba plena para decidir sobre el destino del inculpado. No obstante que la Genética Forense es uno de los más claros ejemplos de una especialidad que día a día se nutre de los recientes avances científicos y tecnológicos, sólo constituye una herramienta más en la investigación de un probable hecho delictuoso. Fallas en la recolección del indicio, el embalaje, la transportación del mismo al laboratorio, el procedimiento analítico, la cadena de custodia y la presentación del dictamen, pueden influir en el ánimo del juzgador llegando incluso a desestimar la prueba. De aquí la importancia en considerar que la actividad del genetista forense no se confina únicamente en el laboratorio; más bien se extiende desde el lugar de los hechos hasta el juzgado o los tribunales.

En el manejo de indicios de naturaleza biológica, el conocimiento sobre las alteraciones bioquímicas que puede sufrir tal indicio cuando se someten a condiciones ambientales extremas por la acción de agentes físicos, químicos o biológicos o a su manipulación inadecuada dentro y fuera del laboratorio, proporcionan al experto en esta especialidad, una herramienta invaluable que le permitirá la comprensión del proceso de deterioro y, por lo tanto, poner en práctica

acciones preventivas para evitar o disminuir el daño de este valioso material, que como sabemos, es un punto específico, irrepetible e irrecuperable de la historia misma [1]. La pérdida del indicio nos condenaría irremediablemente al desconocimiento de la verdad histórica con repercusiones en la resolución jurídica de un hecho que a la luz de la razón reclama justicia.

Conclusión

La Genética Forense se ha convertido en una herramienta muy poderosa en la investigación de asuntos penales y en las disputas de paternidad. Sólo minúsculas cantidades de material biológico son necesarias para obtener resultados útiles en la investigación ministerial. Sin embargo, dada su enorme sensibilidad, también deben modificarse las formas tradicionales del manejo de indicios en el lugar de los hechos a otras más rigurosas, evitando en la medida de lo posible la contaminación de estos materiales. La forma en que el ADN se segrega a la descendencia, es un punto a favor de la identificación humana por este método, comparada con la identificación dactiloscópica: de la huella dactilar de los padres, no será posible deducir la huella dactilar del hijo, por lo que en la investigación de la paternidad biológica, el análisis de ADN se ha considerado como el estándar de oro.

Es de suma trascendencia subrayar que el ADN tiene un alto poder de exclusión, una gran capacidad para descartar sin problemas a la persona falsamente acusada, hecho de especial relevancia, porque la justicia opera en ambas partes del problema legal: reconociendo al culpable y exonerando al inocente.

Hoy por hoy, los avances científicos y tecnológicos aplicados en la investigación criminal, brindan a la sociedad la garantía del esclarecimiento de los delitos. Nos corresponde, como parte de ella, vigilar que nuestras instituciones de justicia realicen su labor con legalidad, honradez, lealtad, imparcialidad, eficiencia y profesionalismo.

Referencias

1. Lorente, J. A. (2004). Un detective llamado ADN. Ediciones Temas de Hoy, S.A. (T.H.) Paseo de Recoletos, 4.28001 Madrid.
2. Martínez, B. (1999). La Prueba de ADN en Medicina Forense, Ed. Masson. Barcelona.
3. Manual Específico de Operación de Servicios Periciales en la Especialidad de Genética Forense. Coordinación General de Servicios Periciales. Procuraduría General de Justicia del D.F. (2004).
4. Jeffreys, A.J., Wilson, V., y Thein, S.L. (1985) Nature 314, 67-73.
5. Jeffreys, A.J., Wilson, V., y Thein, S.L. (1985) Nature 316, 76-79.
6. Beckman, K.B., Abel, K.J., Braun, A., y Halperin, E. (2006) Nucleic Acids Res. 34, e129
7. Lorente, J.A., Entrala, C., Alvarez, J.C. (2001). Croat. Med. J. 42 267-270.
8. Bilge, Y., Kedici, P.S., Alakoc, Y.D., Ulkuer, K.U., y Ilkyaz, Y.Y. (2003) Forensic Sci Int. 137,141-146.
9. Hochmeister, M.N., Budowle, B., Borer, U.V., Rudin, O., Bohnert, M., Dirnhofer, R. (1995), J Forensic Sci. 40, 701-705.
10. Budimlija, Z.M., Prinz, M.K., Zelson-Mundorff, A., Wiersema, J., Bartelink, E. (2003). Croat. Med. J. 44, 259-263.
11. Miazato, E., Soares, J.A. y Romero, D. (2004) Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo 59, 383-388.
12. Alonso, A., Martín, P., Albarran, C., García, P., Fernández de Simon, J., Iturralde, M, Fernández-Rodríguez A., Atienza, I., Capilla, J., García-Hirschfeld, J., Martínez, P., Vallejo, G., García, O., García, E., Real, P., Alvarez, D., León, A., Sancho, M., (2005). Croat. Med. J. 46, 540-548.
13. Budowle, B., Bieber, F.R., Eisenberg, A.J. (2005). Leg Med (Tokyo) 7,230-243.
14. Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg E., y Sullivan, K. (1994) Nat Genet. 6, 113-114.
15. Ivanov, P.L., Wadhams, M.J., Roby, R.K., Holland, M.M., Weedn, V.W. y Parsons, T.J. (1996) Nat Genet. 12, 417-420.
16. Vernesi, C., Di Benedetto, G., Caramelli, D., Secchieri, E, Simoni, L, Katti E, Malaspina, P., Novelletto, A., Marin, V.T., y Barbujani, G., (2001) Proc Natl Acad Sci U S A, 98,13460-13463.
17. Jehaes E., Pfeiffer, H., Toprak, K., Decorte, R., Brinkmann, B., Cassiman, J.J. (2001) Eur J Hum

- Genet. 9, 185-190.
18. Jeffreys, A.J., Allen, M.J., Hagelberg E., y Sonnberg, A. (1993) *Forensic Sci Int.* 56, 65-76.
 19. Cina, M.S.J., Collins, K.A., Fitts, M., Pettenati, M. (2000) *Arch Pathol Lab Med* 124, 1083-1086.
 20. Lee, H.C., Ladd, C. (2001). *Croat. Med. J.* 42, 225-228.
 21. Saferstein, R. (2004). *Criminalistics. An introduction to Forensic Science.* 8ª edición. Ed. Pearson Prentice Hall. New Jersey.
 22. Jobling M.A., Gill, P. (2004) *Nat Rev Genet.* 5, 739-751.
 23. Watson, J.D. y Crick, F.H.C. (1953) *Nature* 171, 737-738.
 24. Klug, W.S. y Cummings, M.R. (1999) *Conceptos de Genética*, 5a ed., Prentice may Ibérica. Madrid.
 25. Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolf, R., Culvert, M., Martín, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlim, E. y White, R. (1987) *Science* 235, 1616-1622.
 26. Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H.A. y Caskey, C.T. (1991). *Am. J. Hum. Genet.* 49, 746-756.
 27. Weber, J.L. y May, P.E. (1989) *Am. J. Hum. Genet.* 44, 388-396.
 28. Urquhart, A., Kimpton, C.P., Downes, T.J. y Gill, P. (1994) *Int. J. Leg. Med.* 107, 13-20.
 29. Wong, Z., Wilson, V., Patel, I., Povey, S. y Jeffreys, A.J. (1987) *Ann. Hum. Genet.* 51, 269-288.
 30. Mullis, K.B. y Faloona, F. (1987) *Meth. Enzymol.* 155, 335-350.
 31. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R.H., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988) *Science* 239, 487-491.
 32. Sullivan, K.M., Mannucci, A., Kimpton, C.P. and Gill, P. (1993). *BioTechniques*, 15, 637-641.
 33. Avilés, C. *El Universal.* Ciudad de México. Miércoles 18 de octubre de 2006
 34. Jobling MA y Tyler-Smith C. (1995) *Trends Genet.* 11, 449-456.
 35. Jobling MA, Pandya A y Tyler-Smith C. (1997) *Int. J. Leg. Med.* 110, 118-124.
 36. White, P., Tatum, O., Deaven, L. y Longmire, J. (1999) *Genomics* 57, 422-437.
 37. Ayub, Q., Mohyuddin, A., Qamar, R., Mazhar, K., Zerjal, T., Medí, S., y Tyler-Smith, C. (2000). *Nucleic Acids Res.* 28 (2), E8.
 38. Gusmao, L., Alves, C. y Amorim, A. (2001) *Ann. Hum. Genet.* 65 (Pt3). 285-291
 39. Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Forensic Science Review Volume Fifteen Number Two July 2003*
 40. Jobling, M. y Gill, P. (2004) *Nat Rev Genet.* 5, 739-751
 41. Gill, P., Ivanov, P.L., Kimpton, C., Piercy, R., Bemson, N., Tully G, Evett Y, Hagelberg E y Sullivan K, (1994). *Nature Genetics* 6, 130-135.
 42. Holland MM y Parsons TJ. (1999). *Forensic Sci. Rev.* 11, 21-50
 43. Sullivan, K.M., Hopwood, R., Lang, B y Gill, P. (1991). *Electrophoresis* 12, 17.
 44. Szibor, R., Michael, M, Spitsyn, VA., Plate I, Ginter EK y Krause D. (1997). *Electrophoresis* 18, 2857-2860.
 45. Budowle, B, Brown, B.L., Allen, R.C. y Baechtel, F.S. (2001) *Forénsica:* 1, 9-22
 46. Lewis R. (2003) *Human Genetics*, Cap. 5, pag. 104.
 47. Álvarez, J.C., Entrala, C., Lorente, J.A., Lorente, M., Fernández-Rosado, F.J., Martínez-Espín, E., Rodríguez, E. y Villanueva, E.. (2001) *Forénsica*, 40-59.
 48. Bendall, K.E., Macaulay, V. A., Baker, J.R. y Sikes, B. (1996) *Am J. Hum. Genet.* 59: 1276.
 49. Salas, A., Lareu, V., Calafell F, Bertranpetit J y Carracedo A. (2000) *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 964-974.
 50. Thomas, R.H., Schaffner, W., Wilson, A.C y Pääbo S. (1989). *Nature* 340, 465-467.
 51. Hagelberg, E., Sykes, B. y Hedges, R. (1989). *Nature* 342, 485
 52. Weir, B. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11654-11659
 53. Johnson P, Williams R. Scott, J. (2004) *Crim. Justice Stud.* 10
 54. Williams, R. y Johnson, P. (2005) *J Law Med Ethics.* 33, 545-558
 55. *Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos.*
 56. *Código de Procedimientos Penales para el D.F.*

Semblanza del QFB María Lourdes Vega Navarrete



Química Farmacéutica Bióloga, egresada de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM, pasante de la maestría en criminalística, ha dedicado la mayor parte de su vida profesional a las ciencias forenses. Fue perito profesional y después perito en jefe del departamento de Genética y Patología Forense de la Procuraduría General de Justicia del D.F. por más de 10 años. Actualmente dirige el Centro de Estudios e Investigaciones Genéticas Anigen, empresa privada que tiene el análisis forense como giro principal, entre los que se incluyen la identificación humana, elaboración de bases de datos (criminal, profesional y poblacional) y pruebas de paternidad; participa en la capacitación de nuevos profesionales en el área y en el diseño y construcción de laboratorios de Genética Forense en la República, es también profesora de asignatura del módulo de genética clínica de la carrera de Q.F.B. en la FES Zaragoza.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

EL PERFIL DE APRENDIZAJE Y LAS INTELIGENCIAS MÚLTIPLES

Linda Sarai Velázquez Coca

Departamento de Desarrollo Académico. Facultad de Medicina. UNAM:
Circuito interior, 3er. piso Edificio B Secretaría de Educación Médica.
lindaveco@yahoo.com.mx

Resumen

Mucho se ha hablado en relación a los estilos de aprendizaje y a las inteligencias múltiples, pero aún no queda claro ¿qué es el estilo de aprendizaje y qué son las inteligencias múltiples?, esperamos que este trabajo pueda proporcionar ciertos elementos básicos con la finalidad de ponerlos en práctica tanto en el aula como en la vida cotidiana.

En este sentido, el propósito de este artículo es que el lector pueda identificar algunos elementos en relación al perfil de aprendizaje y a las inteligencias múltiples, para que pueda llevarlos a la práctica personal y profesional como factor de cambio dentro de una sociedad globalizada.

El artículo consta de apartados que explican de manera sencilla el contexto educativo, la educación médica y los roles docentes, el autoconocimiento, los estilos de aprendizaje y las inteligencias múltiples.

Espero que este artículo abra el interés de los profesores hacia el perfil de aprendizaje y a las inteligencias múltiples pero sobre todo, pueda sensibilizarse hacia su práctica docente.

Palabras clave: Enseñanza-aprendizaje, docente, roles docentes, autoconocimiento, estilo de aprendizaje, inteligencias múltiples

Abstract

Much has been spoken in relation to the ways of learning and to the multiple intelligences but it remains clear, what is the way of learning and what are the multiple intelligences?, we hope that this article could provide basic elements with the purpose of take them into practice in the classroom and in the daily life.

In this way, the intention of this article is that the reader could identify some elements in relation to the profile of learning and the multiple intelligences so they could be taken into the professional and personal practice as factor of change within a globalized society.

The article has paragraphs that explain in a simple way the educational context, the medical education, and the educational roles, the self-knowledge, the ways of learning and the multiple intelligences

We hope that this article creates an interest on the teachers towards the profile of learning and multiple intelligences, but especially, could make them conscious towards their educational practice.

Keywords: Education - learning, teacher, educational roles, self-knowledge, style of learning, multiple intelligences

Introducción

En un mundo tan cambiante, las Instituciones de Educación Superior (IES) tienen un reto impresionante; como institución deben de crear estrategias acordes que puedan adaptarse y se conformen de tal manera que sean lo más viable y retribuíble posible a los actores que están inmersos. Plantearse la forma en que ha de adoptar la intervención en un contexto tan complejo resulta difícil y más en una institución u organización formativa ya que, por su naturaleza, deben de atender tanto valores personales como las exigencias que el contexto sociocultural-económico plantea.

El docente es un agente de cambio dentro de las IES y el principio de este cambio es descubrir su propio proceso; identificar las fortalezas y propiciarlas, así como reconocer las debilidades para simplificarlas. Si podemos conocer estas fortalezas y debilidades en nuestro propio proceso de aprendizaje, podremos hacer lo mismo en el estudiante.

Las IES y la globalización

Vivimos en un mundo globalizado, una nueva era donde se marcan pautas de conducta, valores, lenguaje e incluso las formas de gobierno y de administración. En este mundo de cambio, la universidad fue cuestionada seriamente acerca de sus principios y de la forma en que responde ante este nuevo contexto nacional e internacional. Aunado a esto, la universidad es catalogada como una institución de “base pesada”; término acuñado por Burton y Clark en el que se refiere a aquellas instituciones que, dada su larga trayectoria, poseen elementos como son: la burocracia, su identidad e historia, actores diversos, creencias, mitos y leyendas, un conocimiento propio y generador de ella, la organización del trabajo, etc y que intervienen en la organización y dinámica de la institución [1].

Dadas estas condiciones, las IES están en la mira y deben de responder a una pregunta ¿podrá la universidad generar estrategias para dicho cambio? Y es que, no sólo la institución debe generar dichas estrategias, sino que los mismos actores deben de tomar el reto; se debe de formar para cambiar, cambiar para aprender.

Los docentes y la educación médica

En las facultades de Medicina se ha generado un fenómeno educativo notable: en cada una de ellas es evidente la necesidad de la creación de una dependencia o instancia que se preocupe por el proceso de enseñanza-aprendizaje y que principalmente sea dirigida a dos actores: el docente y el alumno.

Dicha creación es una estrategia institucional, pero ¿qué pasa con el docente? (quien es el sujeto de nuestra preocupación en este texto)

El docente en las facultades de Medicina tiene una labor ardua: no sólo debe estar actualizándose en conocimientos biomédicos sino que también, debe de formarse, estar consciente de la necesidad y la exigencia de su labor docente.

Harden y Crosby en, "The good teacher is more than a lecturer—the twelve roles of the teacher" [2] nos explican acerca de los roles docentes que deben de poseer los docente y es el marco que utilizamos para evidenciar la necesidad de un autoconocimiento.

Harden y Crosby afirman o argumentan que la enseñanza es una actividad compleja que requiere preparación no sólo en el manejo del conocimiento, sino en lo académico, y en este artículo se proporciona una descripción diversa de los roles del docente de la medicina en un contexto donde los cambios ocurren de manera inmediata en la educación médica.

Son doce roles los que se presentan: algunos docentes tendrán uno o dos, la mayoría tendrá varios, sin embargo es pertinente señalar que todos deben de ser atendidos por la institución. La educación médica ha considerado el importante cambio en la última década: la enseñanza integradora, el aprendizaje basado en problemas, el aprendizaje por comunidades, los planes de estudio flexibles, etc. que propician una creciente autonomía en el alumno para el aprendizaje sin embargo, el rol del docente aún es importante.

En este contexto se puede decir que un buen docente es aquel que ayude al alumno a su aprendizaje y es por esto que se han dividido en seis roles básicos diferentes. Algunos roles requieren de una atención especial al área del conocimiento disciplinar y otras al área educativa; en el siguiente esquema se ejemplifica estos roles.

Cada uno de los roles están divididos en otros dos roles: el proveedor o abastecedor de la información tiene al conferencista y al profesor clínico. El modelo a seguir tiene al profesor en el aula y en la clínica, el facilitador tiene al facilitador del aprendizaje y al mentor o tutor, el asesor tiene al asesor del estudiante y el asesor al plan de estudios, el planeador es del plan de estudios y del curso o materia, el diseño de materiales es tanto del creador del recurso y del productor de guías de estudio.

Mientras que en este estudio se han revisado por separado, en realidad todos ellos se interconectan a menudo y se relacionan los unos con los otros; un docente puede asumir varios roles y no es posible que un sujeto pueda tener todos los roles. Una posibilidad para poder propiciar todos los roles es, primero, reconocerlos y después reforzar los que ya se tienen para propiciar los ausentes.

Es necesario un perfil ideal docente, negociarlo y proponerlo para poder validarlo de inmediato por cada uno de los sujetos involucrados; desde los docentes hasta la institución representada por los jefes de departamento.

Como es de esperarse, para ejercer cada uno de éstos roles, debe uno de conocerse así mismo y de eso se trata el siguiente apartado.

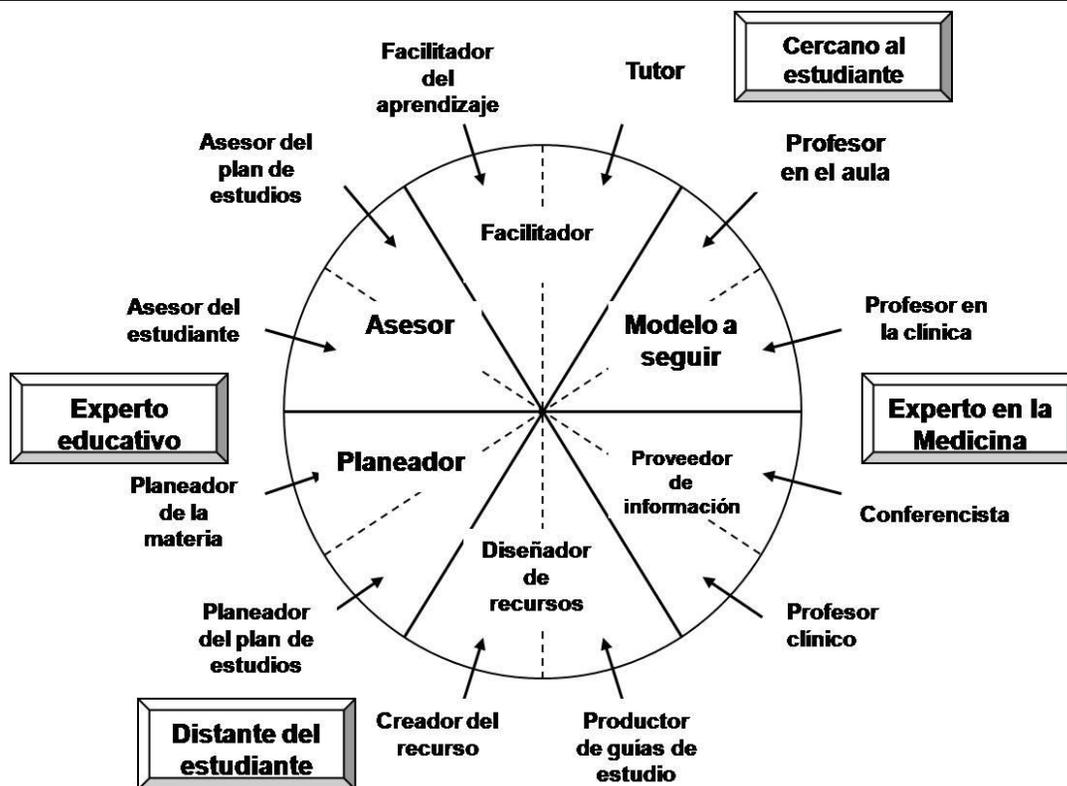


Figura 1. Las 12 funciones del profesor.

Autoconocimiento

A través de las experiencias que tenemos de la vida, vamos consolidando una idea de cuáles son nuestras fortalezas y debilidades, de lo que nos gusta y nos disgusta de nosotros mismos. En este proceso, el sentido de quiénes somos también influye en las elecciones que tomamos y en las cosas que hacemos. ¿Y qué sucede con el éxito académico? ¿Es razonable suponer que hay distintas maneras de alcanzar las metas académicas? Es sorprendente descubrir que no todos aprendemos de la misma manera. Cada uno de nosotros tiene formas preferidas de aprender, enfoques que trabajan mejor con nosotros y nuestro éxito no solamente depende de qué tan bien aprendemos, sino de cómo lo hacemos.

Los estilos de aprendizaje reflejan la forma en que preferimos pensar, adquirir y utilizar del conocimiento. No tenemos un estilo de aprendizaje, sino un perfil de estilos. A pesar de que nuestra capacidad pueda ser idéntica a la de alguien más, nuestros estilos de aprendizaje pueden ser bastante distintos. Posiblemente conoces acerca de los estilos de aprendizaje, recuerda tu vida como estudiante; tal vez te iba bien en biología mientras que luchabas en literatura y es que la biología se refiere a los procesos naturales y puede que los maestros presenten la materia como una serie de hechos relacionados. En cambio, la literatura exige un pensamiento más abstracto requiriendo que analices y sintetices ideas.

Aunque tengamos preferencias generales para un aprendizaje basado en hechos, o para un aprendizaje que exige más pensamiento abstracto, todos utilizamos diversos estilos de aprendizaje. Algunos se refieren a nuestras preferencias acerca de la manera en que la información se nos presenta, otros se relacionan con la manera en que pensamos y otros a la forma en que nuestros rasgos de personalidad afectan nuestro desempeño.

¿Cómo aprendes?

Uno de los aspectos más básicos de los estilos de aprendizaje se refiere a la manera en que recibimos la información a partir de nuestros sentidos, y éste es nuestro estilo receptivo de aprendizaje. Existen cuatro tipos distintos de estilos receptivos de aprendizaje:

Estilo visual/verbal de aprendizaje

Se prefiere la información que se presenta visualmente en un formato escrito; las personas con este estilo, se sienten más cómodos cuando leen y se pueden acordar de la ortografía de una palabra si piensan cuál es la apariencia de ésta. Probablemente se aprende mejor cuando tienes la oportunidad de leer acerca de un concepto que cuando se escucha a un profesor explicando.

Estilo visual/no verbal de aprendizaje

Los estudiantes que tienen este estilo de aprendizaje captan mejor la información cuando se les presenta el material visualmente en un diagrama o en una imagen. Éste tipo de personas pueden recordar la estructura de un compuesto químico si repasan una imagen en su mente y se benefician de los profesores que utilizan con frecuencia ayudas visuales tales como videos, mapas y modelos. A los estudiantes con estilos de aprendizaje visuales se les facilita más ver cosas en el ojo de su mente en lugar de que se les hable al respecto.

Estilo auditivo/verbal de aprendizaje

¿Puedes identificar esta situación? Una persona le pide a un amigo que le ayude a armar algo leyéndole las instrucciones mientras que la otra persona lo hace, bueno éste tipo de estilo es el estilo verbal auditivo de aprendizaje. Las personas que lo tienen prefieren escuchar explicaciones en vez de leerlas. Gustan de las conferencias y los debates en clase por que pueden asimilar fácilmente la información respecto de la cual se esta hablando.

Estilo táctil/kinestésico de aprendizaje

Las personas que lo poseen prefieren aprender haciendo: tocando, manipulando objetos, y haciendo cosas. Por ejemplo, algunas personas disfrutan del acto de escribir debido a la sensación de un lápiz o de un tablero de computación: el equivalente táctil de pensar en voz alta, o quizás encuentren que armar un modelo tridimensional les ayuda a comprender una idea nueva.

Tener un estilo receptivo particular de aprendizaje significa sencillamente que será más fácil aprender el material que se presente en concordancia con él y no quiere decir que ya no puedas aprender de otra manera. Los estilos receptivos de aprendizaje tienen implicaciones para estudiar con eficacia:

- Si tienes un estilo visual/verbal, considera hacer resúmenes por escrito de la información resaltando y subrayando el material escrito y utilizando tarjetas. Transforma los diagramas y las fórmulas matemáticas en palabras.
- Si tu estilo es visual/no verbal, elabora diagramas y tablas. Traduce las palabras en símbolos y figuras.
- Si el tuyo es un estilo auditivo/verbal, recita la información en voz alta cuando estudies. Trabaja con otros en equipos donde comenten el material y considera grabar las clases.

- Si por el contrario es táctil/kinestésico, incorpora movimiento en tu estudio. Dibuja diagramas, construye modelos, prepara carteles y muévelos de un lado a otro. Mantente activo durante la clase, tomando apuntes, dibujando tablas y apuntando los conceptos claves.

Manejo de la información: ¿Te centras en las partes o en el total?

Cuando estas armando un rompecabezas ¿te centras mas en las piezas individuales y en cómo encaja una con la otra o tu estrategia consiste en concentrarte en toda la imagen y en recordar siempre el producto terminado?

La manera en la que te enfrentas a un rompecabezas te da una pista del proceso que utilizas para organizar pedazos de información. Específicamente, tu estrategia es indicativa de cuál de los dos siguientes estilos te resulta más cómodo:

1. Las personas con estilos analíticos de aprendizaje aprenden mejor cuando se les expone primero los componentes individuales y los principios subyacentes a un fenómeno o situación. Una vez que los han identificado, les resulta más fácil determinar y entender cuál es la imagen general y determinar si existen casos particulares que ejemplifiquen el principio.
2. Los que tienen estilos relacionales de aprendizaje aprenden con más facilidad si se les presenta toda la variedad de materiales que se están intentando aprender. Los sujetos con estilos relacionales de aprendizaje lo hacen mejor cuando tienen la imagen completa ya que pueden tener una perspectiva amplia y descomponerla en partes individuales.

Considera intentar comprender la manera en que los alimentos se convierten en energía en una célula: una persona con un estilo más analítico enfocaría la tarea con el aprendizaje de cada uno de los pasos individuales del proceso, del primero al último; en cambio, el del estilo relacional, consideraría el total y se centraría en el proceso completo y general además del objetivo planteado.

Las personas que utilizan el estilo analítico estudian con mayor eficacia si se centra en los hechos y los principios específicos, pues sobresalen en la organización de la información. Es frecuente que trabajen mejor por su cuenta, y la ciencia y las matemáticas les resultan particularmente sencillas. Por otro lado, los estudiantes con un estilo relacional perciben los conceptos globalmente y piensan en términos de la totalidad de la situación. Es posible que les atraigan materias que exigen la capacidad de elaborar un panorama amplio de la materia como son la literatura y la historia.

Éste es el segundo elemento del perfil de aprendizaje, el procesamiento de la información. Ahora veremos el último que tiene que ver con la personalidad del sujeto.

Estilos de Personalidad

Nuestra personalidad también influye en el estilo de aprendizaje. ¿Es probable que vayas a una audición para una producción teatral universitaria o la idea de subirte a un escenario no te atrae en lo absoluto? (si no es que te resulta completamente aterradora) ¿Te relacionas con el mundo que te rodea principalmente mediante una planeación cuidadosa o a través de reacciones espontáneas? Nuestras preferencias personales influyen de manera significativa en las tareas que desarrollamos. Existen cuatro dimensiones fundamentales de la personalidad que resultan críticas, a continuación se describen los extremos de cada dimensión:

Introvertidos frente a extrovertidos. Una diferencia fundamental entre ellos es si disfrutan trabajar con los demás. La independencia es la característica más importante de los individuos introvertidos: disfrutan del trabajo solitario y les afecta menos lo que los demás piensen o cómo se comporten. En cambio, los extrovertidos son sociables y en ellos influye más el comportamiento y la opinión de los otros; disfrutan cuando trabajan con otros y se llenan de energía cuando tienen personas a su alrededor.

Individuos intuitivos frente a individuos sensores. A los intuitivos les agrada resolver problemas y ser creativos; se impacientan con los detalles y prefieren saltar a las conclusiones, disfrutan el reto de resolver problemas y de tener un planteamiento general. En cambio, los sensores prefieren un enfoque concreto y lógico a partir del cual pueden analizar cuidadosamente los hechos de la situación y les gustan los detalles.

Pensadores frente a sensibles. Los pensadores prefieren la lógica a la emoción: llegan a decisiones y resuelven problemas por medio del análisis sistemático de una situación. Los sensibles confían más en sus respuestas emocionales, están conscientes de los demás y de sus sentimientos afectan sus valores y la cercanía de los demás.

Los perceptivos frente a juicio. Antes de llegar a una conclusión los perceptivos intentan recopilar tanta información como puedan, como están abiertos a múltiples perspectivas y aprecian todos los aspectos de una situación, a veces tienen problemas para terminar una tarea. Los que juzgan son rápidos y toman decisiones con prontitud, les gusta fijarse metas, alcanzarlas y luego avanzar a la siguiente tarea sin detenerse al detalle.

Los sentidos, el procesar la información y la personalidad son los elementos que integran un estilo de aprendizaje; éstos son propios de cada sujeto porque cada uno tiene una combinación diferente. Es verdad que podemos encontrar muchas similitudes, y más en un área específica de conocimiento, pero también es cierto que cada uno de nosotros, a parte de nuestro estilo de aprendizaje, poseemos características peculiares y es por ello que debemos de identificar estas inteligencias para un autoconocimiento.

El estilo de aprendizaje y las 7 inteligencias múltiples

De seguro conoces personas que son buenas para las matemáticas o para un razonamiento lógico, también a las que poseen un gran sentido para la comunicación o liderazgo, otras tienen una gran capacidad para conocerse así mismos y otras más para las dimensiones y el espacio. Cada uno de ellos es único y todos, a su manera, brindan contribuciones valiosas a la cultura humana.

Con esta información, ¿Son inteligentes todos ellos?, piensa en tus alumnos ¿Será que el que obtenga las mejores calificaciones es el más inteligente?

Antiguamente se pensaba que el coeficiente intelectual era lo mismo que la inteligencia; pero gracias a las nuevas investigaciones, podemos decir que no [3].

El coeficiente intelectual no es lo mismo que inteligencia, según Gardner existen 7 formas separadas de análisis y éstas dependen del contexto de las diferentes culturas; la inteligencia, por lo tanto, es la interacción entre lo biológico y la oportunidad de aprender existente en una cultura y no sólo en los procesos cognitivos [4].

Cada sujeto tiene: su propia inteligencia, su propio contexto socio-cultural, su propia forma de aprender y su propia forma de enfrentar los problemas; así, todos tenemos inteligencias que se determinan por los genes pero se pueden fomentar o limitar por medio de la práctica. Estas inteligencias pueden ser precisamente el mecanismo o la estrategia para que un sujeto pueda ser competente en una sociedad globalizada.

El profesor Howard Gardner estuvo investigando acerca de las inteligencias, diseñó requerimientos básicos para dar a conocer las inteligencias que hoy conocemos y son las siguientes:

- Debe de ser capaz de tener sus propios símbolos (dibujos, palabras, notas o números).
- Deben de contar con su propia historia de desarrollo y evidenciar su evolución de manera notoria.
- Debe de ser capaz de aislarse neurológicamente a través de la actividad cerebral.

A continuación se describen las siete inteligencias múltiples así como algunas recomendaciones para poder propiciar cada una de ellas.

1. La primera es la inteligencia lingüística es aquella que ejercen el periodista, el escritor, el poeta o el abogado. Las personas con esta inteligencia tienen habilidades para argumentar, persuadir, entretener o instruir en forma efectiva a través de la palabra hablada. Les gustan los trabalenguas o juegos de palabras. Pueden resolver crucigramas o conocer una palabra todos los días para poder propiciarla.
2. La lógica-matemática es la de los números y el razonamiento lógico, la ejercen el científico, el contador o programador de computación. Integra habilidades para razonar en forma secuencial, pensar en términos de causa-efecto, crear hipótesis o buscar patrones numéricos. Para estimularla, realiza operaciones largas (pero no complejas), sin ayuda de una calculadora.
3. La espacial significa pensar en imágenes y tener la aptitud de percibir, transformar y recrear diferentes aspectos del ambiente visual-espacial. Los arquitectos, fotógrafos, artistas, pilotos e ingenieros mecánicos son poseedores de estas habilidades. Sus características predominantes son los detalles visuales, visualizan con gran facilidad, dibujan o bocetan sus ideas y tienen un gran sentido de orientación. Cierra los ojos e imagina tu recámara, ahora, dibújala; puedes realizar además bocetos de cómo sería viajar por tu cuerpo. Así podrás desarrollar esta habilidad.
4. Una inteligencia musical es la que tienen las personas con la capacidad de percibir, apreciar y producir ritmos y melodías; poseen el oído musical, cantar con entonación y tener ritmo. Sentarse y respirar profundo e identificar cada uno de los sonidos que están a tu alrededor es una manera de generar tu inteligencia musical.
5. La corporal o kinestésica es la inteligencia propiamente del cuerpo. Entre sus capacidades está el talento de controlar los movimientos del cuerpo y la manipulación de los objetos. Atletas, artesanos, mecánicos y cirujanos tienen esta habilidad. Permite cocer, modelar, hacer carpintería o pueden ser logros físicos como esquiar, patinar, escalar, bailar, nadar o realizar cualquier actividad. Bailar un pedazo de música o realizar alguna actividad ya sea manual o que incluya todo tu cuerpo ayuda a generar dicha inteligencia.
6. La sexta es la inteligencia interpersonal, es la habilidad para entender y trabajar con otras personas; tienen como capacidades la de percibir y responder a los estados de ánimo, temperamentos, intenciones y deseos de otros de manera óptima. Los directores de eventos, líderes, negociadores, gestores, maestros o un administrador de empresas son propietarios de ellos. Éstos llegan a ser sujetos compasivos y comprometidos con la sociedad. Haz una lista de las personas que están a tu alrededor y escribe acciones de cómo poder mejorar tu relación con ellos.
7. En la séptima, las habilidades son las de reconocer los propios sentimientos, distinguir entre las diferentes emociones internas y el uso consciente para tomar nuestras propias

decisiones. La llamamos, inteligencia intrapersonal y podemos propiciarla escribiendo un diario o reflexiones acerca del día o de cómo te sientes; puedes también hacer algo placentero como comer un helado o ver algún atardecer.

Conclusiones

La realidad es una, la universidad a través de los docentes es la responsable directa de formar estos sujetos competentes en una sociedad globalizada. ¿Cómo hacerlo?. Desarrollando nuestros estilos de aprendizaje y las inteligencias múltiples. Identificar cómo aprendes, desde nuestros sentidos hasta nuestra propia personalidad lo cual hace que lo descubramos también en nuestro alumno y así, poder llevarlo a un proceso de aprendizaje mucho más significativo.

El primer paso para poder ser parte de un cambio institucional es en nosotros mismos. Un autoconocimiento, es decir, una adecuada comprensión de nosotros mismos, ayuda no sólo a los estudiantes, sino a nosotros como sujetos de cambio.

Referencias

1. Burton, R. y Clark, El Sistema de Educación Superior. Una visión comparativa de la organización académica, UNAM, 2000, pag. 13.
2. Harden y Crosby, J. The good teacher is more than a lecturer—the twelve roles of the teacher, Centre for Medical Education University of Dundee, Reino Unido. Medical Teacher, Vol. 22, No. 4, 2000.
3. Campbell L. B. Inteligencias múltiples: usos prácticos para la enseñanza y el aprendizaje, Troquel, Argentina, 2000.
4. Gardner, H. Inteligencias múltiples. La teoría en la práctica. Barcelona: Paidós, 1995.
5. Gairín, J. Estrategias de formación para el cambio organizacional. Cambiar para formar, formar para aprender. Barcelona: Praxis y La universidad Nacional Autónoma de Barcelona, 2003
6. Feldman S. R. Aprendizaje con poder, México, Mc Graw Hill, 2006

Semblanza de la Lic. Linda Sarai Velázquez Coca



Lic. en Pedagogía egresada de la Facultad de Estudios Superiores Acatlán, UNAM con especialización en Planeación y Administración Educativa. Incursiona en la Facultad de Medicina con el proyecto de Diagnóstico de Necesidades de Formación y Actualización Docente donde se empapa de la problemática institucional y académica creando un sentimiento de compromiso hacia la Facultad. Actualmente es responsable del Programa de Formación Docente y del Programa de Apoyo Académico a Alumnos de la Facultad de Medicina en la Secretaría de Educación Médica donde tiene la oportunidad de trabajar con los actores principales del proceso de enseñanza-aprendizaje dentro y fuera de la Facultad.

*“El método de nuestro tiempo
consiste en usar no uno,
sino múltiples modelos de exploración”*

Marshall McLuhan



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LA SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES A TRAVÉS DE LA VÍA MEP; UN NUEVO BLANCO DE MANIPULACIÓN PARA LA SALUD Y EL BENEFICIO HUMANO

Patricia León y Arturo Guevara-García

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México.
patricia@ibt.unam.mx

Resumen

Los isoprenoides son moléculas esenciales sintetizadas por todos los organismos y la mayor diversidad de estos compuestos se presenta en las plantas. Todos los isoprenoides se derivan de dos unidades básicas, el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetil-alil difosfato (DMAPP). En las plantas, estos precursores se sintetizan por dos vías que operan en diferentes compartimentos celulares. La vía mevalónica, presente en el citoplasma y la vía del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP), de reciente descubrimiento, que está confinada a los plástidos. La vía MEP es responsable de la síntesis de una variedad de isoprenoides que incluyen fitohormonas, pigmentos fotosintéticos, acarreadores de electrones, antioxidantes y moléculas de defensa. Más allá de estas funciones primarias, muchos isoprenoides tienen gran importancia médica y biotecnológica. Por ejemplo, las provitaminas A y E son nutrientes esenciales para la salud humana, mientras que el taxol es uno de los compuestos más usados para tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer. Por otro lado, un inhibidor específico de la vía MEP, la fosmidomicina, ha demostrado ser un excelente agente antimalárico. Debido al papel central que la vía MEP desempeña para el desarrollo de plantas y la salud humana, el estudio de los mecanismos que regulan a esta vía es de suma importancia. En contraste con la vía mevalónica también empleada por algunos organismos para síntesis de isoprenoides, la caracterización de la vía MEP es aún incipiente. A través del aislamiento y caracterización de plantas mutantes, nuestro grupo ha podido identificar y corroborar la funcionalidad de varios de los genes que participan en esta vía. Estas plantas mutantes están alteradas en el desarrollo del cloroplasto y nuestros datos muestran que las enzimas de la vía MEP son esenciales para el desarrollo de las plantas superiores y funcionan de una manera celular no-autónoma. A través del uso de plantas transgénicas con alteraciones en los niveles de algunas de las enzimas de la vía MEP,

identificamos a la enzima deoxi D-xilulosa sintetasa (DXS) como una de las enzimas que la controlan. Finalmente, nuestros estudios muestran que los genes y las proteínas de la vía MEP están sujetas a una regulación compleja. Hemos corroborado que la acumulación de los mensajeros de la vía se encuentra modulada por señales internas (tejido específico) y externas (luz y ciclo circadiano). Nuestros estudios comparativos a nivel de proteína han permitido descubrir la existencia de un mecanismo novedoso de regulación que modula los niveles de la enzima DXS. Los resultados obtenidos abren avenidas importantes para el conocimiento básico de esta vía y también para posibles manipulaciones futuras.

Palabras clave: Isoprenoides, metabolitos secundarios, plástidos

Abstract

Isoprenoids are essential molecules synthesized by all organisms, but their highest variety is found in plants. All isoprenoids are derived from two basic units, the isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In plants, two pathways that operate in different cellular compartments synthesize the universal precursors. The mevalonic pathway takes place in the cytoplasm and in plastids the synthesis of these units rely on a novel route known as the 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) pathway. Derived from the MEP pathway, a variety of essential isoprenoids are synthesized including phytohormones, photosynthetic pigments, electron carriers, antioxidants and defense molecules. Beyond these functions, many plastidic isoprenoids are of biotechnological and medical importance. The provitamin A and vitamin E are basic nutrients for human health and taxol is used as a chemotherapeutic agent. Also inhibitors that block the MEP pathway, such as fosmidomycin, have been evaluated as anti-malarial agents. Based on the central role that the MEP pathway plays for the growth and development in plants, the identification of the regulatory steps is of major importance. In contrast to the mevalonic pathway, the molecular characterization of the MEP pathway is limited. The isolation and characterization of mutants in the pathway corroborate the functionality of these genes. These mutants have alterations in chloroplast development. Also mutant analysis during embryogenesis demonstrates that they act non-cell autonomously, where partial maternal complementation of chloroplast development is observed. Alterations in the level of MEP pathway enzymes in transgenic plants, allowed identify that the first enzyme of this route 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate sintetase (DXS), which plays a key role in the control of the isoprenoid biosynthesis. Finally, our work has shown that the genes in this pathway are subject to complex regulatory circuits. This metabolic pathway is regulated by multiple signals at the transcript and protein levels in a coordinated form. The expression of the genes in the pathway is tissue specific and is also modulated by a variety of external signals. Our comparative analysis at the protein level of the entire route has uncovered a novel regulatory circuit that potentially affect the efficiency of this pathway and that appears conserved in higher plants.

Keywords: Isoprenoids, secondary metabolites, plastids

Abreviaturas usadas

cla: mutante "cloroplastos alterados", *clb:* mutante "cloroplastos biogénesis", CMK: 4-difosfocitidil-2-metil-D-eritritol cinasa, CMS: 4-difosfocitidil-2-metil-D-eritritol sintasa, Co A: coenzima A, DMAPP: dimetil-alil difosfato, DXP: 1-dioxi-D-xilulosa 5-fosfato, DXR: 1-dioxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa, DXS: 1-dioxi-D-xilulosa 5-fosfato sintetasa, GA3-P: gliceraldehído 3-fosfato, HMBPP: 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato, HMGR: 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa, HDR: 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato reductasa, HDS: 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato sintasa, IDI: isopentenil difosfato isomerasa, IPP: isopentenil difosfato, *ISPH:* gen que codifica para la enzima HDR, *ISPG:* gen que codifica para la enzima HDS, MCS: 2C-metil-D-eritritol 2-4-difosfato sintasa, MEP: 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato, MVA: ruta mevalónica

Introducción

Uno de los rasgos distintivos de las células vegetales, es la presencia de compartimientos subcelulares semiautónomos (organelos) conocidos como *plástidos*. Dentro de los plástidos se realizan muchas vías metabólicas indispensables para la planta como son la fotosíntesis, la síntesis de aminoácidos, la síntesis de lípidos y la síntesis de gran cantidad de metabolitos conocidos como isoprenoides o terpenos. Los isoprenoides desempeñan funciones variadas, muchas de ellas esenciales para el desarrollo y la diferenciación de todos los seres vivos incluyendo las plantas y también para la salud humana [1]. Los isoprenoides son tal vez el grupo de productos naturales más diverso, del cual hasta ahora se han descrito decenas de miles de estos compuestos. Aunque los isoprenoides son sintetizados por todos los organismos vivos, en las plantas se producen la mayor variedad de éstos. Las funciones que realizan los isoprenoides también son muy variadas e incluyen funciones primarias como: componentes estructurales de membranas, reguladores de crecimiento (hormonas), fotoprotectores (pigmentos) así como metabolitos secundarios como moléculas protectoras de patógenos, atrayentes, olores, sabores, etc. [1,2]

A pesar de la diversidad en estructura y función de los diferentes isoprenoides todos ellos derivan de la condensación de dos unidades comunes de cinco carbonos: el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetil-alil difosfato (DMAPP) (Fig. 1). Estos dos bloques estructurales se unen en diferente número y sufren diversas modificaciones como ciclizaciones, oxidaciones e hidroxilaciones a través de diferentes reacciones enzimáticas para producir la gran diversidad de isoprenoides. Los isoprenoides han sido clasificados de acuerdo al número de unidades básicas que los constituyen, con base en la llamada "regla del isopreno" propuesta por Wallach en 1987 (Fig. 1). La biosíntesis de cada uno de estos compuestos es sumamente complicada y no es el objetivo de este capítulo entrar en detalle para cada una de éstas, de manera que solo mencionaremos algunos aspectos y características de los diferentes isoprenoides:

-Hemiterpenos. El isopreno, formado por una sólo unidad isoprénica (C_5), es un compuesto volátil producido por microorganismos y plantas que es considerado por muchos autores como el único hemiterpeno. Cabe mencionar que algunos investigadores también consideran como hemiterpenos a derivados del isopreno que contienen oxígeno como el prenol y el ácido isovalérico.

-Monoterpenos. Estos compuestos están formados por dos unidades isoprénicas (C_{10}). Dentro de los monoterpenos encontramos a la mayoría de las esencias volátiles de flores, así como aceites esenciales de hierbas y especies dentro de los que se encuentran el mentol y el geraniol. Estos compuestos son de especial interés ya que frecuentemente se emplean como perfumes y saborizantes. Particularmente el geraniol producido en las zanahorias, el limón y otras plantas, presenta propiedades antioxidantes y ha sido utilizado para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

-Sesquiterpenos. Estos son compuestos formados por tres unidades isoprénicas (C_{15}). A este grupo pertenecen varios compuestos producidos por las plantas con funciones de defensa y atrayentes para insectos [3]. Entre los sesquiterpenos más conocidos se encuentra el farnesol ($C_{15}H_{26}O$), que es un pesticida natural y que también funciona como una ferohormona para insectos. En la industria el farnesol es usado como fijador en perfumes y saborizante para cigarrillos.

-Diterpenos. Están formados por cuatro unidades isoprénicas (C_{20}). A este grupo pertenece el taxadieno que es precursor del taxol, una de las drogas más utilizadas en la actualidad para tratamiento del cáncer. Adicionalmente, dentro de los diterpenos encontramos a la provitamina E o retinol, así como al fitol, que es la parte isoprénica de la molécula de clorofila. Finalmente, algunos autores incluyen a la hormona vegetal giberelina como un diterpeno.

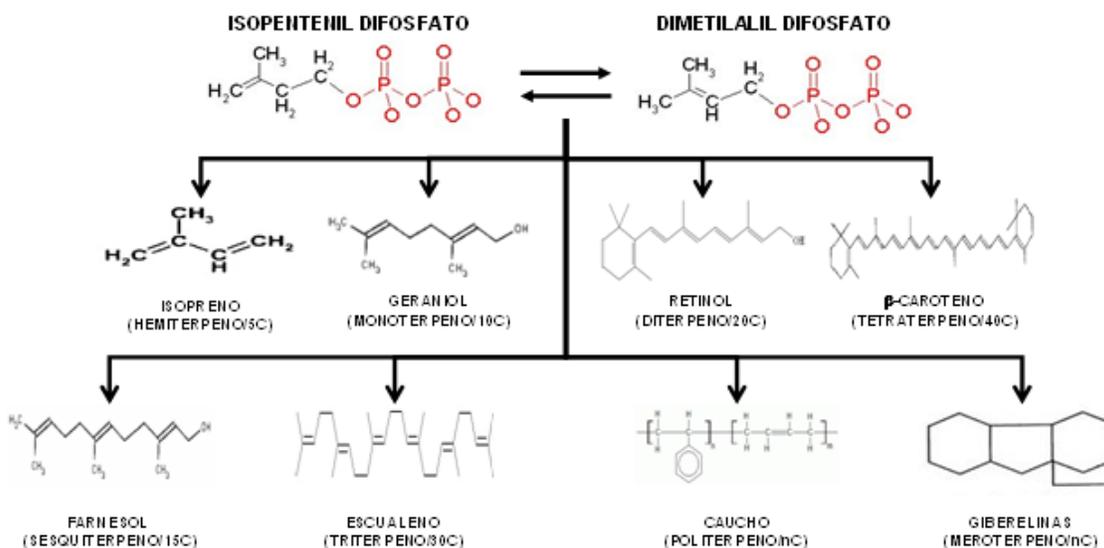


Fig. 1. Estructura Química de Isoprenoides.

La estructura química de los precursores universales de isopentenil difosfato (IPP) y dimetil-alil difosfato (DMAPP) se muestra en la parte superior. En la parte inferior se muestran ejemplos representativos, con sus estructuras, de cada uno de los grupos de isoprenoides constituidos por diferentes números de unidades básicas y clasificados de acuerdo a la "regla del isopreno".

-Triterpenos. Están formados por 6 unidades isoprénicas (C₃₀). El escualeno, que es el ingrediente principal de aceite de hígado de tiburón, es un triterpeno. Este compuesto es el precursor estructural de todos los compuestos esteroideos, incluyendo al colesterol y las hormonas esteroideas (estrógenos y andrógenos), que controlan la diferenciación sexual en humanos. Entre los triterpenos sintetizados por las plantas se encuentran a las hormonas brasinoesteroides, a los componentes esenciales de la membrana vegetal, como el fitoesterol, y a los compuestos de defensa conocidos como fitoalexinas.

-Tetraterpenos. Los tetraterpenos están formados por ocho unidades isoprénicas (C₄₀). A este grupo pertenecen los carotenoides, que son pigmentos producidos por algunas bacterias, algas y plantas, esenciales para la fotosíntesis. Los carotenos son responsables de varios de los colores de flores y frutos, como el licopeno, que da el color rojo de los jitomates y chiles o el β-caroteno, al que deben su característica coloración naranja las zanahorias. Los carotenos son uno de los antioxidantes naturales más importantes y son indispensables para todos los organismos vivos incluyendo a los humanos quienes debemos de obtenerlos a partir del consumo de vegetales (provitamina A). Por lo tanto, los carotenos tienen un alto interés biotecnológico, ya que son aditivos de una gran cantidad de productos alimenticios debido a sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Adicionalmente, estos compuestos se usan comercialmente para la fabricación de bronceadores y cremas bloqueadoras.

-Politerpenos. Este grupo de compuestos está formado por múltiples unidades isoprénicas. Entre los politerpenos más usados están el latex, que es empleado en la fabricación de guantes y preservativos, y el hule, de donde se obtiene el caucho para la fabricación de las llantas para automóviles.

-Meroterpenos. La estructura de algunos compuestos como la clorofila, la vitamina E (también llamada tocoferol) y hormonas vegetales como las citocininas y las giberelinas, está formada sólo parcialmente de isoprenoides [4]. Estos isoprenos se unen a otros compuestos, como son el fitol,

en el caso de la clorofila o el ácido homogentísico en el tocoferol, para producir la molécula activa por lo cual se les denomina meroterpenos.

Rutas de biosíntesis para las unidades básicas de los isoprenoides (IPP y DMAPP)

Tradicionalmente se asumía que los precursores isopentenil difosfato (IPP) y dimetil-alil-difosfato (DMAPP) eran sintetizados por todos los organismos vivos a través de una ruta metabólica universal denominada vía mevalónica (MVA) [5]. Sin embargo, varios resultados experimentales relacionados a la biosíntesis de algunos isoprenoides en plantas y en bacterias no se podían explicar de forma clara a través de la síntesis de estos compuestos por la ruta MVA. Investigaciones de varios grupos dieron como resultado el descubrimiento de una vía independiente para la síntesis de isoprenoides [6]. Actualmente se sabe que tanto el IPP como el DMAPP pueden ser sintetizados por dos rutas metabólicas independientes cuya evolución es un ejemplo notable de convergencia ya que no parece existir relación alguna entre las enzimas que participan en cada una de ellas [7]. La vía MVA opera en el citoplasma de prácticamente todos los eucariotes (Tabla I). Mientras que la vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) está presente en la mayoría de las eubacterias y en organismos fotosintéticos como algas y plantas superiores, pero está ausente en las arqueobacterias, hongos y animales, por lo que estos organismos sintetizan todos sus isoprenoides exclusivamente a través de la vía mevalónica. (Tabla I). Por lo tanto, en algas como en plantas la biosíntesis de isoprenoides se realiza a través de ambas rutas (Fig. 2). La vía MVA es responsable de la síntesis de isoprenoides citoplásmicos, mientras que la vía MEP tiene lugar en los plástidos [8-10].

Tabla I. Distribución de las vías de biosíntesis de isoprenoides en los diferentes reinos de organismos.

ORGANISMO	Ruta de Biosíntesis		
	MVA		MEP
Eubacterias	+	O	+
Arqueobacterias	+		-
Protozoarios	+		+
Algas	+	y/o	+
Plantas Superiores	+		+
	(Citoplasma)		(plástidos)
Hongos	+		-
Animales	+		-

MVA. Vía mevalónica.

MEP. Vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato.

Resulta interesante la ruta MEP también es utilizada por algunos protozoarios del género apicomplexa, que contienen organelos derivados de plástidos como *Plasmodium* y *Toxoplasma*, que son agentes causales de diversas enfermedades en humanos [11]. Otros protozoarios relacionados con tripanosoma, como *Leishmania*, aunque no contienen apicoplastos, si contienen genes para la vía MEP y se demostró que usan esta vía para la síntesis de isoprenoides esenciales.

La distribución diferencial de ambas vías en diferentes tipos de organismos, aunado al hecho de que muchos microbios que infectan a mamíferos hacen uso exclusivo de la vía MEP para producir isoprenoides, convierte a estas enzimas en un blanco potencial para identificar nuevas drogas antimicrobianas, que recién se ha comenzado a explotar y que se comentará más adelante.

El descubrimiento de los pasos enzimáticos que conforman una vía metabólica es indispensable para entender su regulación y mecanismos de acción, por lo tanto, no es sorprendente que ambas vías de síntesis de isoprenoides son, y hayan sido, objeto de intenso estudio por múltiples laboratorios en el mundo. El descubrimiento de la vía MEP es relativamente reciente y nuestro grupo ha participado en la caracterización de dicha ruta. Nuestras contribuciones al respecto abarcan desde la identificación de genes de la vía en plantas, hasta la caracterización de elementos que la regulan. A continuación se describe brevemente algunos de los avances más importantes de la caracterización y descubrimiento de las vías de síntesis de los bloques estructurales de isoprenoides, IPP y DMAPP, incluyendo algunos de los logros y perspectivas de nuestro trabajo.

La vía mevalónica

La vía MVA (Fig. 2) se caracterizó hace casi 50 años y por mucho tiempo se le consideró como la vía universal para la síntesis de IPP y DMAPP. Esta vía inicia a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-coenzima A (CoA) por la acción de tres enzimas que producen ácido mevalónico (Fig. 2), que es el primer intermediario comprometido de esta vía y de donde deriva su nombre. A través de tres enzimas adicionales el ácido mevalónico es convertido a IPP. Finalmente, la enzima IPP isomerasa (IDI) utiliza este compuesto como sustrato para producir DMAPP [12]. De los múltiples estudios bioquímicos, genéticos y moleculares de la vía mevalónica destaca la identificación de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa (HMGR) que es uno de los pasos limitantes de la ruta (Fig. 2). La HMGR está codificada por una familia de genes cuyo número varía en diferentes especies. Estos genes están sujetos a una regulación compleja, incluyendo expresión tejida específica y por múltiples señales ambientales. Sin embargo, la caracterización bioquímica de la enzima HMGR es aún limitada, entre otras cosas, debido a lo difícil de su purificación. Tal vez uno de los logros más importantes de los estudios clásicos de la vía MVA es el desarrollo de inhibidores de la actividad de la enzima HMGR que actualmente son usados para la prevención y terapia de enfermedades cardiovasculares [13]. El análisis de la expresión y regulación de los genes *HMGR*, así como la caracterización de otros genes y productos de la vía MVA, es la línea de investigación actual de diversos grupos de investigación alrededor del mundo. Por ejemplo, recientemente ha sido reportado que una mutación en el gen *HMGR* en *Drosophila melanogaster* resulta en letalidad embrionaria a causa de deformaciones en el desarrollo del corazón [14].

La vía MEP

Su descubrimiento

Los trabajos pioneros de la síntesis de isoprenoides llevaron a concluir que la vía MVA era responsable de la biosíntesis de isoprenoides en todos los organismos vivos. Sin embargo, estudios posteriores sobre la síntesis de algunos isoprenoides específicos, produjeron resultados contradictorios que sugerían la existencia de una ruta alterna. En particular destacan los estudios en bacterias con la síntesis de hoponoides (isoprenoides de la pared celular de bacterias) y ubiquinonas, en los cuales se encontró que cuando se utilizaba como sustrato el acetato radioactivo (^{13}C) éste no se incorporaba en dichos compuesto [15]. Estos resultados pusieron en duda que el acetato fuera el precursor para estos compuestos. Paralelamente, experimentos en plantas donde también se seguía la incorporación de compuestos radioactivos en isoprenoides mostraron que mientras que el carbono radioactivo derivado del CO_2 se incorporaba rápidamente en terpenos sintetizados en plástidos (carotenoides, fitol y plastoquinona), el carbono proveniente del acetato o mevalonato radioactivo era incorporado rápidamente sólo en isoprenoides producidos en el citoplasma (la ubiquinona, el estigmasterol y el campesterol).

Finalmente, estudios utilizando cloroplastos aislados demostraron de manera inequívoca

que estos organelos eran incapaces de sintetizar IPP y DMAPP a partir de ácido mevalónico [15]. A partir de estos resultados, complementados con el uso de inhibidores de la vía MVA, sentaron claras evidencias de la existencia de una vía alterna para la síntesis de isoprenoides. En 1993, diferentes grupos de manera independiente publicaron evidencias claras de la existencia de una nueva vía para la síntesis de isoprenoides tanto en bacterias como en plantas [16,17]. A esta vía se le ha denominado MEP, con base en el primer intermediario comprometido, el 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (Fig. 2). Los experimentos iniciales sugirieron que la primera reacción de esta vía involucraba la condensación de una molécula de piruvato con el gliceraldehído 3-fosfato (GA3-P) a través de una enzima del tipo tranacetolasa. La identificación del gene para dicha enzima, a la que se le denominó 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintetasa (DXS), se dió por tres grupos independientes [18-20]. En plantas estos hallazgos fueron apoyados con la caracterización genética y molecular, realizada por nuestro grupo, de una mutante letal sin pigmentos (albina), a través de la cual se identificó al primer gene de la vía MEP (DXS) [21].

La identificación de las enzimas y los genes correspondientes para cada uno de los pasos de la vía MEP, así como los mecanismos de reacción para cada una de ellas, se obtuvo en un tiempo record de menos de 10 años, a través del uso de estrategias multidisciplinarias incluyendo genética, biología molecular, genómica comparativa y bioinformática. Así, se identificaron los siete pasos biosintéticos, sus genes y sus enzimas correspondientes, que constituyen la vía MEP, requeridos para la síntesis de IPP y DMAPP en plástidos (Fig. 2).

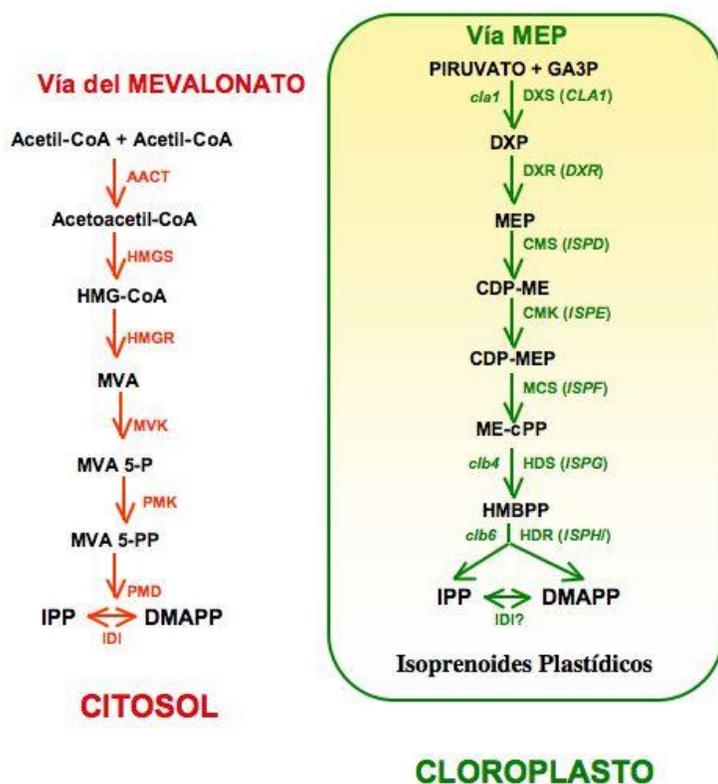


Fig. 2. Rutas de biosíntesis de isoprenoides en plantas.

Se muestran las dos rutas independientes para la síntesis de isoprenoides en plantas y el compartimento en el que se encuentran. La ruta mevalónica, en el citosol (rojo) y la MEP, dentro de plástidos (verde). En cada caso se muestran sus intermediarios y precursores (negro) y las enzimas que catalizan cada paso.

Vía del Mevalonato (MVA): CoA (Coenzima A); HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA); MVA (ácido mevalónico); MVA 5-P (mevalonato 5-fosfato); MVA 5-PP (mevalonato 5-difosfato); IPP (isopentenil-difosfato); DMAPP (dimetil-alil difosfato); AACT (aceto acetil CoA tiolasa); HMGS (HMG-CoA Sintasa); HMGR (HMG-CoA Reductasa); MVK (mevalonato cinasa); PMK (fosfo-mevalonato cinasa); PMD (fosfo-mevalonato descarboxilasa); IDI (isopentenil difosfato isomerasa).

Vía MEP: GA3P (Gliceraldehído 3-fosfato); DXP (1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato); MEP (2C-metil-D-eritritol 4-fosfato); CDP-ME (4-difosfocidil-2-C-metil-D-eritritol); CDP-MEP (CDP-ME 2-fosfato); ME-cPP (metil eritritol-2,4-ciclodifosfato); HMBPP (1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato); DXS (DXP sintasa); DXR (DXP reductoisomerasa); CMS (CDP-ME sintasa); CMK (CDP-ME cinasa); MCS (ME-cPP sintasa); HDS (HMBPP sintasa); HDR (HMBPP reductasa). Entre paréntesis se incluye el nombre de los genes de plantas, usando la nomenclatura de Arabidopsis. En el lado izquierdo de la ruta se indica el nombre de las mutantes de *Arabidopsis thaliana* identificadas y caracterizadas por nuestro grupo, señalando la enzima afectada.

Su síntesis

Como se mencionó, el primer paso de la vía MEP condensa el piruvato y el GA3-P a través de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintetasa (DXS), produciendo el producto 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) (Fig. 2). En el segundo paso biosintético, el DXP es convertido

a 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), por la acción de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa (DXR) [22,23]. Este paso se postula como el primer intermediario comprometido de la vía, ya que el DXP en bacterias también se utiliza como precursor en la síntesis de las vitaminas B6 y B1. Sin embargo, estudios recientes en plantas sugieren que estas vitaminas son sintetizadas a través de una ruta biosintética no relacionada [24]. En los pasos subsiguientes de la vía, el MEP es transformado en 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) por la acción consecutiva de las enzimas 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato sintasa (CMS) [25], 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato cinasa (CMK) [26], 2C-metil-D-eritritol 2-4 difosfato sintasa (MCS) [27] y 2C-metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa (HDS) [28] (Fig. 2). En el último paso de la vía, la enzima 1-hidroxi-2-metil-butenil 4-difosfato reductasa (HDR) [29], convierte el 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) en isopentenil difosfato (IPP) y dimetil-alil difosfato (DMAPP) que son los productos finales de esta ruta biosintética. La funcionalidad de varios de estos genes fue demostrada a través del rescate de mutantes de bacterias. En el caso de la vía MEP, se ha demostrado que la enzima HDR es capaz de sintetizar una mezcla de IPP y DMAPP, en una relación 1:5 [8], lo que constituye una diferencia con la vía MVA, donde existe una enzima responsable para dicha conversión [8].

La vía MEP es esencial para la supervivencia de las plantas

Una estrategia utilizada con éxito para la identificación de proteínas necesarias en el proceso de diferenciación y función de plástidos es a través de la obtención y caracterización de mutantes. La mayoría de los productos requeridos para la regulación y el funcionamiento de los plástidos, se encuentran codificados en el núcleo. Plantas mutantes, incapaces de realizar una función adecuada de sus cloroplastos, generan un fenotipo carente de pigmentos de muy fácil selección (Fig 3A). A pesar de que este tipo de mutantes en general son letales y mueren rápidamente después de su germinación, su caracterización y aislamiento es factible a través de la selección de plantas heterocigotas viables que segreguen el fenotipo de interés (Fig. 3B).



Figura 3. Mutantes albinas.

(A) Fenotipo de plantas del tipo silvestre (Wt) y albino (Alb). B) Silícula o vaina de una planta heterocigota donde segregan embriones albinos mutantes.

En nuestro grupo utilizando a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se generó una colección de mutantes afectadas en el desarrollo del cloroplasto [30]. La caracterización de algunas de dichas plantas permitió la identificación de varios de los genes involucrados en la vía MEP en plantas superiores. Así se demostró que la mutante *cla1-1* está afectada en el gen que codifica para la primera enzima (DXS) de la vía MEP [21]. Esta planta presenta un fenotipo albino (Fig. 4A) y el desarrollo temprano del cloroplasto está alterado, conteniendo plástidos que asemejan a proplástidos (Fig. 4B). El fenotipo letal de esta mutante permitió demostrar que el gen *CLA1*, también llamado actualmente *DXS*, es indispensable y no redundante para el desarrollo de las plantas superiores [21]. La caracterización de otras mutantes albinas de nuestra colección (denominadas *clb* por *chloroplast biogenesis*), ha permitido identificar a otros de los genes requeridos en la vía MEP en plantas superiores. Así con la caracterización de la mutante *clb4*, hemos identificado al gen *ISPG* (Fig. 4C), que codifica para la enzima HDS [30].

De forma semejante, la caracterización de la mutante *clb6* permitió aislar el gen *ISPH* (Fig. 4C) que codifica para la enzima DHR [31]. Estas enzimas participan en el sexto y último paso de la vía MEP (Fig. 2). La caracterización morfológica y bioquímica de estas mutantes también nos permitió demostrar que los genes de la vía MEP actúan de forma no autónoma celular, es decir, que sus funciones pueden ser parcialmente compensadas por otros tejidos, incluyendo el tejido materno en el caso de embriones mutantes. Esta característica no se comparte con otras mutantes albinas no relacionadas de nuestra colección como *clb1*, *clb2*, *clb3* y *clb5* (Fig. 5). Estudios semejantes han sido publicados para otros genes y proteínas de la vía por otros grupos [32-34].

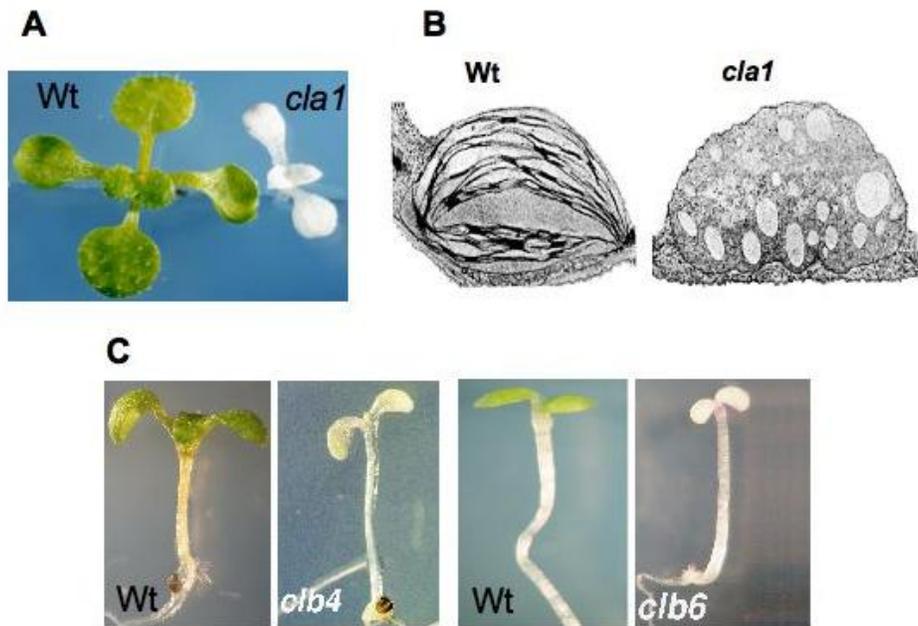


Figura 4. Mutantes de la vía MEP

A) Fenotipo de la planta mutante *cla1-1* comparada con una planta de tipo silvestre (wt). B) Microscopía electrónica de los cloroplastos de la planta mutante *cla1*, comparados con los de una planta de tipo silvestre (Wt) en la que se aprecia un desarrollo normal de las membranas internas. C) Fenotipos de las plantas mutantes *clb4* y *clb6* con sus correspondientes tipos silvestres.

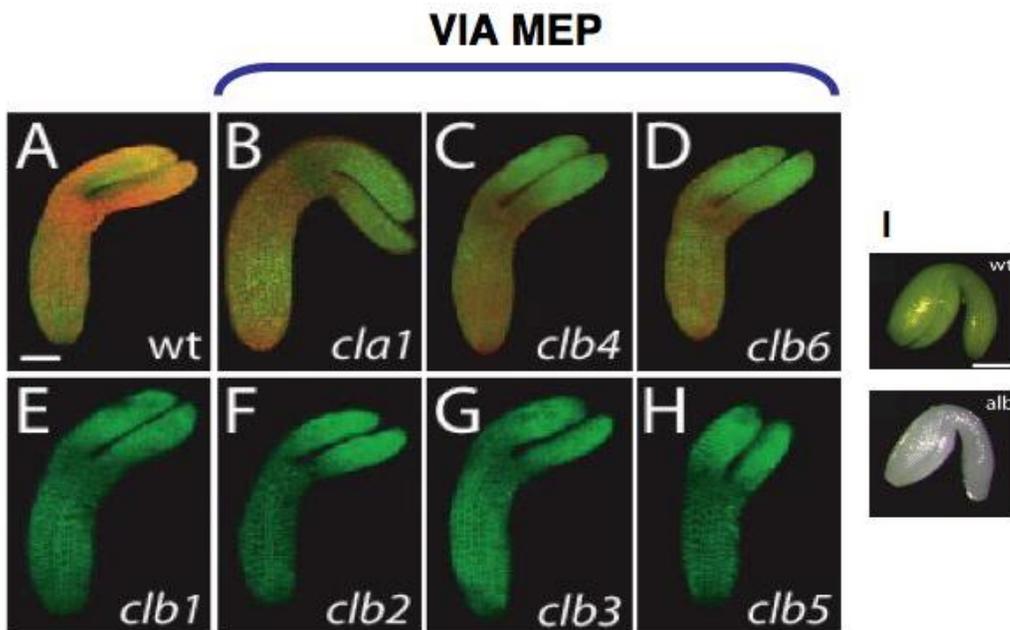


Figura 5. Acumulación de clorofila en embriones albinos de las mutantes *clb*.
 Reconstrucción por microscopía confocal de la fluorescencia de la clorofila en embriones inmaduros del tipo silvestre (wt) (A) y en las plantas mutantes albinas *cla1-1* (B) y mutantes *clb* (de la C a la H). Los niveles de clorofila se aprecian por el color rojo en los embriones y con base en ellos se distinguen dos grupos: no-autónomas celulares, aquellas que acumulan clorofila (fluorescencia en rojo) en el embrión y autónomas celulares, aquellas que no acumulan clorofila a niveles detectables. Las no-autónomas celulares corresponden a mutantes de la vía MEP. El color verde de los embriones se debe a la expresión de una proteína marcadora de pared celular denominada 29-1, fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP) con el propósito de facilitar la visualización de las células que conforman al embrión. (I) Microscopía óptica de los embriones de tipo silvestre (wt) y mutantes (alb), sobre los cuales se realizó la microscopía de fluorescencia.

Regulación de la vía MEP en plantas

La eficiencia de las vías metabólicas varía dependiendo del estado de desarrollo del organismo y de factores externos. La identificación de las señales y mecanismos que regulan una vía es fundamental para su entendimiento y eventual manipulación. En el caso de la vía MEP, una vez identificados los diferentes pasos metabólicos y las enzimas que participan en ella, uno de los aspectos de mayor interés en el área es identificar los mecanismos de regulación que la modulan. La caracterización de nuestras mutantes en *Arabidopsis* ha sido también útil para identificar varios de los mecanismos de regulación que operan sobre la vía MEP en plantas. Con base en el análisis de patrones de expresión nuestros estudios han demostrado que tanto los transcritos, como las proteínas de la vía MEP, se acumulan principalmente en tejidos fotosintéticos y durante el desarrollo temprano de la plántula [30, 31, 35] (Fig. 6). Es probable que estos patrones de expresión respondan a la alta demanda de pigmentos (clorofilas y carotenos), que se requieren para el establecimiento de los complejos fotosintéticos durante el desarrollo temprano en las plantas. También nuestros estudios han mostrado que la expresión de los genes de la vía MEP se modula por distintas señales externas, como la luz y el ciclo circadiano, e internas, como son los niveles de azúcares [31].

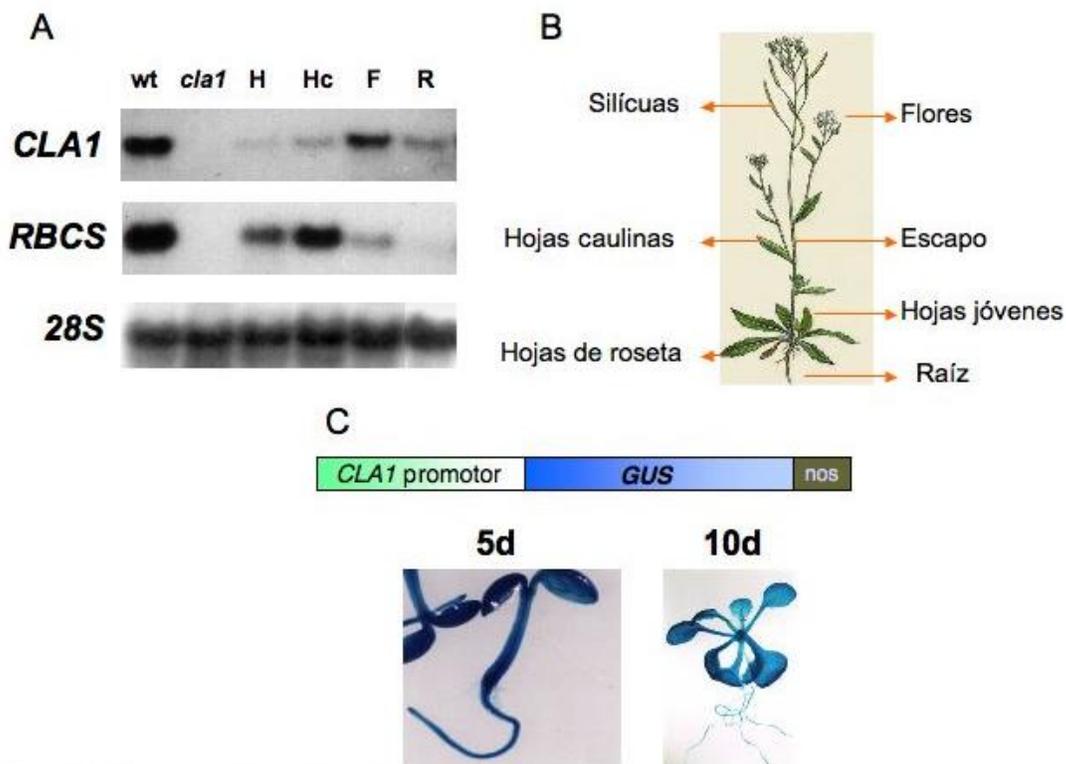


Figura 6. CLA1 se expresa diferencialmente en plantas

(A) Expresión del gen *CLA1* en diferentes tejidos de la planta. RNA total de plántulas silvestres (wt), y mutantes (*cla1*) de 15 días obtenido de hojas de roseta (H), hojas caulinas (Hc), flores (F) y raíz (R). (B) Representación gráfica de los órganos de *Arabidopsis* usados en el panel (A). (C) Patrón de expresión del promotor del gen *CLA1*. Se muestran plantas transgénicas que expresan el gen reportero beta-Glucuronidasa (GUS) bajo la regulación del promotor del gen *CLA1* (diagrama). La actividad del promotor se detecta por el color azul de GUS en plantas de 5 y 10 días donde el promotor del gen *CLA1* se expresa a altos niveles.

En general, dentro de cualquier ruta biosintética sólo algunas de las enzimas que constituyen la vía tienen la capacidad de limitar su flujo. Por lo tanto, la eficiencia con la que una vía trabaja depende en gran medida de los niveles y actividad de dichas enzimas, a las que se les conoce como "limitantes". En nuestro grupo, la caracterización funcional de la proteína DXS, a través de la manipulación de sus niveles de expresión en plantas transgénicas, permitió demostrar que esta enzima es limitante para la síntesis de IPP y DMAPP en las plantas [36]. Estos resultados han sido posteriormente confirmados por otros grupos tanto en plantas como en bacterias. Por lo tanto, actualmente en adición a *Arabidopsis* hemos extendido nuestro análisis hacia la DXS de maíz, que es una planta de especial interés agronómico. A diferencia de otros genes de la vía que están codificados por un sólo gen, DXS está codificado en plantas por una pequeña familia de genes [10,37]. En maíz, hemos demostrado la existencia de dos genes para la enzima DXS con patrones de expresión muy diferentes y que ambos parecen contribuir conjuntamente a los niveles enzimáticos totales. Estos estudios muestran la complejidad a la que está sujeta la expresión de esta enzima limitante en diferentes plantas y abre una interesante posibilidad para su eventual manipulación. Finalmente, a través del estudio de las proteínas de la vía, hemos podido evidenciar un mecanismo de regulación novedoso a nivel post-transcripcional que modula la acumulación de la proteína DXS. Hemos demostrado que este mecanismo está conservado en varias especies vegetales, incluyendo *Arabidopsis* y maíz, desempeñando un papel importante en la modulación de los niveles de esta proteína clave para la vía.

Aplicaciones del estudio de la vía MEP

El descubrimiento y caracterización de la vía MEP ha abierto nuevos horizontes para el uso y posible manipulación de esta vía para la producción de isoprenoides. Debido al enorme número de compuestos que se derivan de ella no resulta sorprendente el interés por su modificación y manipulación. Sin embargo, ninguno de estas posibles aplicaciones serían factibles sin un entendimiento profundo de las reacciones, las enzimas y los genes, así como los mecanismos que la regulan. Algunas de las líneas que se vislumbran para su uso se describen a continuación.

Producción de carotenoides

Los carotenoides constituyen una familia de pigmentos vegetales con más de 600 miembros, de los cuales el 10 % tienen actividad de vitamina A. En plantas y organismos fotosintéticos los carotenoides desempeñan funciones como pigmentos fotosintéticos accesorios, capaces de absorber luz de longitudes de onda variables para optimizar la captación de energía luminosa. Adicionalmente los carotenos tienen un papel clave como fotoprotectores por su capacidad de inactivar especies reactivas de oxígeno. En humanos es claro el papel central que la vitamina A desempeña, la cual es indispensable para nuestro desarrollo. Sin embargo, la función de los otros carotenoides, ingeridos diariamente a través del consumo de frutas y verduras, no es del todo clara. Numerosos estudios sugieren una gran variedad de efectos benéficos, incluyendo prevención de ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, fotosensibilidad cutánea, cataratas y degeneración muscular. Durante los últimos años se ha incrementado notablemente la demanda de carotenos tanto para el consumo humano como suplementos alimenticios y para su adición en bloqueadores solares y fármacos. Esto ha despertado un creciente interés de varios grupos de investigación para mejorar e incrementar la producción de estos compuestos [2, 4, 38]. Siendo los carotenos, isoprenos del grupo de los tetraterpenos derivados de la vía MEP, es predecible que cualquier alteración molecular o bioquímica que impacte a esta vía puede tener un efecto positivo (o negativo) en su producción. Como se mencionó, nuestro grupo de investigación demostró que la enzima DXS es un paso limitante en la vía MEP, por lo que cambios en los niveles de esta enzima se reflejan en los niveles de carotenos sintetizados. Por lo tanto, DXS representa un paso de la vía MEP susceptible de ser manipulado. Cabe remarcar que la manipulación genética de plantas en la mejora del contenido de carotenoides ya tiene sus primeros productos en el mercado, que incluyen al camote anaranjado (con un alto contenido de β -caroteno) y al arroz dorado (que contiene alrededor de 23 veces más carotenoides). A pesar de estos logros, es importante resaltar que el conocimiento sobre los mecanismos regulatorios que controlan la síntesis de carotenos requiere aún de estudios básicos incluyendo aquellos relacionados con la vía MEP, como con los pasos finales de su biosíntesis, en los que participan al menos 20 enzimas adicionales.

Identificación de antibióticos novedosos

Otro de los aspectos que ha despertado especial interés relacionado al uso de la vía MEP, es la generación de nuevos antibióticos. Como se mencionó, esta vía es requerida para la síntesis de isoprenoides esenciales por muchos parásitos de animales superiores (Tabla 1). Los estudios filogenéticos han mostrado que esta vía (enzimas y genes) están totalmente ausentes en animales superiores, incluyendo a humanos. Estos hallazgos abren la posibilidad de emplear esta ruta como blanco para el desarrollo de nuevos fármacos que inhiban a dicha vía funcionando como agentes antimicrobianos para contrarrestar la creciente resistencia hacia los fármacos actualmente disponibles que han desarrollado muchos patógenos.

En particular vale la pena destacar que *Plasmodium falciparum*, el agente causal de la malaria responsable de la muerte anual de más de 2 millones de niños menores de 5 años alrededor del mundo, depende de la vía MEP para la síntesis de sus isoprenoides. Por lo tanto, este parásito es susceptible de ser controlado a través del empleo de compuestos químicos que inhiban de manera específica a cualquiera de las enzimas participantes en esta vía [39]. De hecho, la fosmidomicina, un antibiótico natural producido por *Streptomyces lavendulae*, que inhibe de manera específica la actividad de la enzima DXR, que controla el segundo paso de la vía MEP, ha demostrado ser un buen tratamiento en el control de la malaria incluso más efectivo que otros agentes como la cloroquinona [40]. Diferentes esfuerzos en la búsqueda de compuestos derivados de la fosmidomicina con mayor poder inhibitorio, mayor absorción gastrointestinal y menos efectos colaterales indeseables (la fosmidomicina causa ligera irritación de la mucosa intestinal en algunos pacientes) están actualmente en progreso.

Otro aspecto importante derivado del estudio de la vía MEP con fines de salud pública que ha tomado auge en los últimos años, es la identificación del HMBPP (1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato), producto de la enzima HMBPP sintetasa (HDS), correspondiente al sexto paso de la vía (Fig. 2). Este compuesto se ha encontrado que es el activador más potente conocido (EC_{50} 0.1 nM) de las células T V- α -9/V β -2, que desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune contra microbios patógenos [41]. Este descubrimiento, convierte a este producto en un buen candidato para el desarrollo de vacunas contra diferentes patógenos importantes entre los que se incluyen *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* y *Plasmodium falciparum*, por mencionar algunos [11].

Por otra parte, el aumento de los niveles y de la actividad de las enzimas de la vía MEP es también objeto de estudio intenso. En este sentido los enfoques genéticos y moleculares para esclarecer los mecanismos regulatorios de la ruta, junto con el uso de técnicas cristalográficas para la identificación de residuos claves en la catálisis y estabilidad de las enzimas de la vía serán de suma importancia. De los resultados de investigaciones multidisciplinarias sobre la vía MEP, es de esperarse que la identificación y comercialización de nuevos fármacos para el control de la malaria y otras enfermedades infecciosas, se alcance en pocos años. Un aspecto no menos importante, es la posibilidad de usar inhibidores de la actividad de las enzimas de la vía MEP como herbicidas, con la gran ventaja de que serían inócuos para el consumo humano. Finalmente, cabe destacar que ya que esta vía se encuentra altamente conservada entre los diferentes organismos, el uso de las plantas como organismos modelo es muy tentador. Por lo tanto, creemos que la información que resulte de nuestros análisis impactará el conocimiento general de esta vía en otros organismos.

Referencias

1. Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H., y Gotoh, N. (1995) Am. J. Clin. Nutr. 62 (6 Suppl), 1322S-1326S.
2. Enfissi, E. M. A., Fraser, P. D., Lois, L. M., Boronat, A., Schuch, W., y Bramley, P. M. (2005) Plant. Biotech. J. 3, 17-27.
3. Gang, D. R. (2005) Annu Rev Plant Biol 56, 301-325.
4. DellaPenna, D., y Pogson, B. J. (2006) Annu Rev Plant Biol 57, 711-738.
5. Chappell, J. (1995) Ann. Rev. Plant Mol. Biol. 46, 521-547.
6. Rohmer, M. (1999) A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate. Pergamon, Oxford.
7. Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W., y Croteau, R. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97, 13172-13177.
8. Eisenreich, W., Rohdich, F., y Bacher, A. (2001) Trends Plant Sci 6(2), 78-84.
9. Lichtenthaler, H. K. (1999) Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50, 47-65.
10. Rodríguez-Concepción, M., y Boronat, A. (2002) Plant Physiol 130, 1079-1089.
11. Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Türbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D., y Beck, E. (1999) Science 285, 1573-1576.
12. Bach, T. J., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A., y Vollack, K. U. (1999) Crit. Rev. Biochem. Mol.

- Biol. 34, 107-122.
13. Slater, E. E., y MacDonald, J. S. (1988) *Drugs* 36 Suppl 3, 72-82.
 14. Yi, P., Han, Z., Li, X., y Olson, E. N. (2006) *Science* 313(5791), 1301-1303.
 15. Rohmer, M. (1999) *Nat Prod Rep* 16, 565-574.
 16. Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., y Sahm, H. (1993) *Biochem J.* 295, 517-524.
 17. Flesch, G., y Rohmer, M. (1988) *Eur J Biochem* 175(2), 405-411.
 18. Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, T., Grolle, S., De Graaf, A. A., Taylor, S. V., Begley, T. P., Bringer-Meyer, S., y Sahm, H. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12857- 12862.
 19. Lange, B. M., Wildung, M. R., McCaskill, D., y Croteau, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 95, 2100-2104.
 20. Lois, L. M., Campos, N., Rosa-Putra, S., Danielsen, K., Rohmer, M., y Boronat, A. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2105-2110.
 21. Mandel, M. A., Feldmann, K. A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M., y León, P. (1996) *Plant J* 9, 649-658.
 22. Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Dairi, T., y Seto, H. (1998) *Tetrahedron Lett* 38, 4509-4512.
 23. Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., y Seto, H. (1998) *Proc Natl Acad.Sci USA* 95, 9879-9884.
 24. Tambasco-Studart, M., Titiz, O., Raschle, T., Forster, G., Amrhein, N., y Fitzpatrick, T. B. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(38), 13687-13692.
 25. Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., y Zenk, M. H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11758-11763.
 26. Lüttgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Sagner, S., Senk, A., y Eisenreich, W. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1062-1067.
 27. Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Luttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A., y Rohdich, F. (2000) *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 97(6), 2486-2490.
 28. Altincicek, B., Kollas, A. K., Eberl, M., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Hintz, M., Beck, E., y Jomaa, H. (2001) *FEBS Lett.* 499, 37-40.
 29. Campos, N., Rodriguez-Concepcion, M., Seemann, M., Rohmer, M., y Boronat, A. (2001) *FEBS Lett* 488(3), 170-173.
 30. Gutiérrez-Nava, M. L., Gillmor, C. S., Jiménez, L. F., Guevara-García, A., y León, P. (2004) *Plant Physiol* 135, 471-482.
 31. Guevara-García, A. A., San Roman, C., Arroyo, A., Cortés, M. E., Gutiérrez-Nava, M. L., y León, P. (2005) *Plant Cell* 17, 628-643.
 32. Hsieh, M. H., y Goodman, H. M. (2005) *Plant Physiol* 138(2), 641-653.
 33. Hsieh, M. H., y Goodman, H. M. (2006) *Planta* 223(4), 779-784.
 34. Budziszewski, G. J., Lewis, S. P., Glover, L. W., Reineke, J., Jones, G., Ziemnik, L. S., Lonowski, J., Nyfeler, B., Aux, G., Zhou, Q., McElver, J., Patton, D. A., Martienssen, R., Grossniklaus, U., Ma, H., Law, M., y Levin, J. Z. (2001) *Genetics* 159, 1765-1778.
 35. Estévez, J. M., Cantero, A., Romero, C., Kawaide, H., Jiménez, L. F., Kuzuyama, T., Seto, H., Kamiya, Y., y León, P. (2000) *Plant Physiol* 124, 95-103.
 36. Estévez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., y León, P. (2001) *J Biol Chem* 276, 22901-22909.
 37. Walter, M. H., Hans, J., y Strack, D. (2002) *Plant J* 31, 243-254.
 38. Bramley, P. M. (1994) *Biochem Soc Trans* 22(3), 625-629.
 39. Testa, C. A., y Brown, M. J. (2003) *Current pharmaceutical biotechnology* 4(4), 248-259.
 40. Lell, B., Ruangweerayut, R., Wiesner, J., Missinou, M. A., Schindler, A., Baranek, T., Hintz, M., Hutchinson, D., Jomaa, H., y Kremsner, P. G. (2003) *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(2), 735-738.
 41. Eberl, M., Hintz, M., Reichenberg, A., Kollas, A. K., Wiesner, J., y Jomaa, H. (2003) *FEBS Lett* 544(1-3), 4-10.

Semblanza de la Dra. Patricia León



Realizó sus estudios de Licenciatura en Biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM. Al término de sus estudios ingreso al Instituto de Investigaciones Biomédicas, donde realizó su trabajo de tesis bajo la dirección de la Dra. Gómez Eichelman. Posteriormente, ingresó al posgrado de Investigaciones Biomédicas donde realizó su maestría bajo la dirección de la Dra. Alejandra Covarrubias. Al término de su maestría se incorporó al grupo de la Dra. Virginia Walbot en la Universidad de Stanford, para realizar una maestría relacionada con sistemas vegetales. Más tarde ingreso al doctorado en Investigaciones Biomédicas, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Covarrubias el tema de trabajo verso sobre sistemas de expresión transitoria en frijol. Al término del doctorado obtuvo la beca PEW con la que realizó una estancia postdoctoral en la Universidad de Harvard en el laboratorio de la Dra. Jen Sheen. Como Investigador, ha laborado en el Centro de Investigación sobre Fijación del Nitrógeno y más tarde en el Instituto de Biotecnología, donde ha estado trabajando como líder de grupo desde hace 10 años. Actualmente, es Investigador titular de tiempo completo y ha dirigido varias tesis de licenciatura, maestría y doctorado. El interés particular de su grupo está relacionado con el desarrollo del cloroplasto y las diversas funciones que este organelo realiza. También parte de su grupo trabaja en los mecanismos de percepción y señalización de glucosa en plantas. Para realizar sus proyectos de investigación ha recibido diversos apoyos de instituciones nacionales (DGAPA y CONACYT) como Internacionales, dentro de las que resalta la fundación *Howard Hughes Medical Institute* como "*International Scholar*". Tiene varias publicaciones internacionales relacionadas con su área de investigación en revistas de alto prestigio.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER CERVICOUTERINO EN ETAPAS MÚLTIPLES

Patricio Gariglio Vidal
Depto. Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional
Ave. Instituto Politécnico Nacional No. 2508
Col. San Pedro Zacatenco, 07360 México, D.F.
vidal@cinvestav.mx

Resumen

El cáncer, en general, es un proceso iniciado por agentes medioambientales (compuestos químicos, radiaciones, virus), los cuales pueden provocar mutaciones en genes que le proporcionan a la célula ciertas ventajas en su crecimiento. En carcinogénesis, intervienen básicamente dos clases de genes: los oncogenes y los genes supresores de tumores (también llamados antioncogenes). Los oncogenes se caracterizan porque las proteínas que codifican regulan positivamente el crecimiento y la división celular y son el producto alterado de genes denominados protooncogenes. Las proteínas oncogénicas tienen actividad aumentada si se comparan con las proteínas protooncogénicas. Por su parte, los genes supresores de tumor tienen como característica importante la de inhibir el crecimiento y la proliferación celular. Frecuentemente, la expresión de los antioncogenes se inhibe durante el desarrollo de una neoplasia por mecanismos epigenéticos, tales como metilación de la región promotora. Adicionalmente, algunos virus pueden contribuir al desarrollo de tumores humanos empleando diferentes mecanismos que van desde la estimulación de la proliferación celular y la interferencia con vías apoptóticas hasta la inmunosupresión.

Palabras clave: Cáncer, oncogenes, antioncogenes, HPV, apoptosis.

Abstract

Brown adipose tissue is a thermogenic organ only present in mammals. Its remarkable heating capacity is mainly due to the high content of mitochondria and the presence in their inner membrane of the uncoupling protein UCP1. UCP1 is a proton carrier that allows a controlled dissipation of the proton gradient generated by the respiratory chain. The protein's activity is regulated by two ligands. Purine nucleotides maintain the protein inhibited under non-thermogenic conditions. Fatty acids act as second messengers for noradrenaline and activate the proton conductance. The molecular mechanism of transport and its regulation are still controversial but available data point to fatty acids as a prosthetic group with the carboxylate participating in the proton translocation pathway. Recently, a number of proteins homologous to UCP1 have been described not only in many phyla within the animal kingdom but also in plants and fungi. This ubiquitous presence suggests that the uncoupling of the oxidative phosphorylation may be a general strategy adopted by living organisms to adjust the energetic efficiency. UCPs have been shown to play a significant role in a variety of biological processes. However, it appears that the most prominent one would be as part of the defence mechanisms against oxidative stress. An increase in the respiratory activity due to an increased proton leakage would lead to a decrease in the production of reactive oxygen species.

Keywords: Mitochondria, Bioenergetics, Transport, Efficiency, Uncoupling Protein

Introducción

El estilo de vida y el aumento en el promedio de edad de la población incrementan el riesgo de ciertos tipos de cáncer. El cáncer en general no es hereditario, sino más bien, es un proceso iniciado por agentes medioambientales (compuestos químicos, radiaciones, virus), los cuales pueden provocar una mutación en algún gen que le proporciona a la célula ciertas ventajas en su crecimiento. En divisiones sucesivas de las células mutadas se puede introducir una segunda y posteriormente otras mutaciones en genes que favorecen cada vez más la división descontrolada de los nuevos tipos celulares. Después de varios años de la primera mutación, se llega a una célula altamente maligna, capaz de dividirse sin control y muy resistente a la quimioterapia o radioterapia. Una definición moderna de cáncer (o neoplasia) debe incluir los conceptos de aumento o descontrol de la proliferación celular y de inhibición de los mecanismos normales de apoptosis o muerte celular genéticamente programada. A pesar de esto, en algunos tumores se ha reportado un alto grado de apoptosis.

Actualmente se posee un conocimiento detallado de los genes, proteínas y procesos que controlan tanto el ciclo celular como la apoptosis. Se ha llegado a establecer que en el inicio y en el desarrollo de las primeras etapas de una neoplasia, es decir en carcinogénesis, intervienen básicamente dos clases de genes: los oncogenes y los genes supresores de tumores (también llamados antioncogenes). Los oncogenes se caracterizan porque las proteínas que codifican regulan positivamente el crecimiento y la división celular y son el producto alterado de genes denominados protooncogenes. Las proteínas oncogénicas tienen una actividad aumentada si se compara con las proteínas protooncogénicas. Por su parte, los genes supresores de tumor tienen como característica importante la de inhibir el crecimiento y la proliferación celular (1). Sin embargo, frecuentemente la expresión de los antioncogenes se inhibe durante el desarrollo de lesiones malignas, por mecanismos epigenéticos, tales como metilación de la región promotora o desacetilación de histonas en regiones cercanas al promotor.

Las mutaciones que dan origen a los oncogenes, debido a su carácter dominante no se heredan; sin embargo, aquellas que afectan a los genes supresores de tumor pueden en algunos casos transmitirse a la descendencia. Ciertos oncogenes inhiben vías apoptóticas y favorecen la progresión de una neoplasia; sorprendentemente, otros oncogenes incrementan o favorecen la apoptosis. Debido a esto, durante la carcinogénesis se establece en la célula pre-neoplásica una

presión selectiva, de tal forma que para su sobrevivencia debe introducirse una segunda mutación que le permita escapar a la apoptosis. Frecuentemente, el cáncer es iniciado por agentes medioambientales que causan mutaciones en oncogenes, genes supresores de tumor o incluso en genes involucrados en reparación del daño al DNA. Para que un tumor maligno se desarrolle, deben mutar de 4 a 6 genes relacionados con ciclo celular, inmortalización, estabilidad genómica, apoptosis, invasión, angiogénesis y/o metástasis. En otras palabras, el cáncer tiene un origen genético y en su desarrollo participan varios genes que van llevando a la invasión gradual de uno o varios tejidos del paciente.

Adicionalmente, algunos virus pueden contribuir al desarrollo de tumores humanos; estos agentes patógenos usan diferentes mecanismos que van desde la estimulación de la proliferación celular y la interferencia con vías apoptóticas hasta la inmunosupresión. El virus del Epstein-Barr, de la hepatitis B, varios tipos de papilomavirus humanos (HPV) y el virus de la leucemia humana de células T (HTLV, del inglés Human T lymphocyte virus) se asocian consistentemente a cánceres específicos. Sin embargo, la infección con estos virus no es suficiente para inducir neoplasias. Los largos períodos de latencia (varias décadas) entre la infección y el desarrollo de un carcinoma, el bajo porcentaje del total de individuos infectados que desarrolla cáncer, así como diversos datos experimentales, sugieren que se necesitan otros factores para que se origine un tumor maligno después de la infección viral. Por ejemplo, la infección persistente por algunos tipos de HPV de alto riesgo (HR-HPV, del inglés "high-risk" HPV), tales como HPV16 y HPV18, es considerada como factor de riesgo en cáncer genital, pero se necesita la alteración de oncogenes celulares, de genes supresores de tumor y de otros genes para que se desarrolle un cáncer genital francamente invasor (2). Una de nuestras líneas de investigación puede servir como ejemplo de lo mencionado anteriormente, ya que se relaciona con la posibilidad de que los estrógenos administrados por tiempos largos cooperen con HR-HPV en el desarrollo del cáncer cervicouterino (CaCu); en colaboración con el grupo del Dr. P. Lambert (Mc Ardle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin Medical School), hemos encontrado en ratones transgénicos para los oncogenes virales del HPV16 que el tratamiento crónico por 6 meses con 17β -estradiol, el cual lleva al desarrollo de CaCu, causa defectos en una importante vía supresora de tumores (la vía del TGF β).

Actualmente, el conocimiento de las bases moleculares del cáncer es muy extenso; este entendimiento es un requisito importante no sólo para el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y para el diseño de métodos terapéuticos más efectivos, sino también para el establecimiento de medidas preventivas con sólidos fundamentos científicos. Diversos laboratorios trabajan arduamente para entender en detalle las cascadas de proteincinasas que regulan el ciclo celular, así como los distintos mecanismos apoptóticos alterados en las células cancerosas. Actualmente, la mayoría de las estrategias usadas en la clínica para combatir el cáncer, consideran los mecanismos que controlan el ciclo celular (incluyendo a oncogenes y antioncogenes) y la apoptosis de las células malignas como eventos fundamentales. Gran parte de los compuestos citotóxicos usados como anticancerígenos realizan su función mediante la inducción a la apoptosis de las células tumorales, lo cual lleva a pensar que una falla en el tratamiento quimioterapéutico puede ser debida a un defecto en alguna vía apoptótica. El acercamiento de profesionales del área médica a las investigaciones recientes en biología molecular, específicamente en oncogenómica y oncoproteómica, ayudará a que en un futuro próximo, el médico interprete adecuadamente el diagnóstico molecular con el fin de aplicar estrategias modernas de terapia, incluyendo la terapia génica. En este trabajo se mencionan algunos aspectos de la Oncología Molecular que nos permitirán acercarnos a las bases moleculares del cáncer humano, en particular a la genética molecular del CaCu.

Proliferación celular, inestabilidad genómica, apoptosis y cáncer humano.

El crecimiento y proliferación de las células normales está regulado por factores de crecimiento, hormonas y citocinas. Una característica muy importante de la célula cancerosa se refiere a su capacidad para proliferar sin control, ya sea en ausencia de factores de crecimiento o

incluso en presencia de señales inhibitoras del crecimiento tales como TGF β . El producto de varios protooncogenes y genes supresores de tumor controla directa o indirectamente el avance del ciclo celular; la célula cancerosa difiere notablemente de una célula normal en los mecanismos involucrados en dicho avance, es decir, en la serie de eventos coordinados que involucran periodos sucesivos de replicación del DNA y de división celular. En el ciclo celular podemos distinguir la fase G1 entre la mitosis (fase M) y la replicación del DNA (fase S); después de la fase S, tenemos la fase G2 y finalmente la fase M. En las fases G, aumenta la masa y volumen celular y se establecen los puntos de bloqueo o control negativo del ciclo celular. Es generalmente en la fase G1 cuando las células detienen su proliferación y se retiran del ciclo celular; estas células, ahora en fase G0 pueden iniciar el proceso de diferenciación celular; cultivos de células normales pueden inducirse a entrar en fase G0 al depletar el medio de cultivo de factores de crecimiento; sin embargo no ocurre lo mismo con las células transformadas, las cuales a pesar de la falta de factores de crecimiento no entran a la fase G0. Dos tipos de proteínas son de gran importancia en la regulación del ciclo celular: las ciclinas, que varían en concentración durante el ciclo y las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks, del inglés Cyclin dependent kinases). Los factores de crecimiento activan la expresión de ciclinas con lo cual se activan las Cdks y se induce una cascada de fosforilaciones de proteínas que llevan al avance normal del ciclo celular. Después de que una célula recibe un estímulo mitogénico se inducen rápidamente las ciclinas del tipo D, que se asocian con Cdk4 y Cdk6 (Fig. 1). Más tarde, varias horas antes de que inicie la fase S, se induce la síntesis de la ciclina E la cual forma un complejo con Cdk2. Posteriormente, en plena fase S aparece el complejo ciclina A/Cdk2 y más adelante, en el límite de G2/M, se forma el complejo ciclina B/Cdc2 (Fig. 1). Algunas ciclinas pueden estar sobreexpresadas o alteradas estructuralmente en ciertas neoplasias (3); además, algunos genes que codifican inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas pueden estar dañados en cánceres humanos (3). Las células cancerosas presentan alteraciones en las vías que están regulando el ciclo celular tanto de forma positiva como negativa. Se ha observado que las células cancerosas son capaces de producir factores de crecimiento; estos factores interaccionan con receptores protéicos ubicados en la membrana de las células para inducir el crecimiento y la proliferación celular. Los receptores a factores de crecimiento generalmente son proteínas que atraviesan la membrana citoplasmática; contienen un dominio extracelular al cual se une el factor de crecimiento y un dominio citoplasmático que puede activarse y transmitir señales bioquímicas hacia el interior de la célula. El proceso por el cual la unión de un factor de crecimiento (o ligando) lleva a la activación de una vía intracelular se conoce como transducción de señales. Se ha observado que las células cancerosas son capaces de modificar los receptores para factores de crecimiento de tal manera que estos pueden inducir la progresión del ciclo celular sin la necesidad de recibir un estímulo externo. Un factor de crecimiento interesante es el vaso endotelial (VEGF), que estimula la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis (formación de capilares y vasos sanguíneos dentro del tumor). La angiogénesis mediada por el VEGF está asociada con inhibición de la apoptosis y con el aumento de la expresión del gen bcl-2. Al ser la angiogénesis una etapa crítica para el crecimiento del tumor, varios grupos de investigación trabajan en estrategias para abatirla y lograr así importantes métodos de terapia en cáncer. Otras alteraciones en las vías de transducción de señales presentadas por las células cancerosas provienen de mutaciones de los componentes citoplasmáticos o nucleares que intervienen en dichas vías, incluyendo a factores de transcripción.

Además del avance descontrolado del ciclo celular, las células tumorales son capaces de escapar a la muerte observada en cultivos de células normales; en el caso de las células que se pueden propagar indefinidamente se habla de un cultivo establecido o de líneas celulares inmortalizadas. Estas células inmortales se consideran preneoplásicas ya que contienen alteraciones en su cariotipo y presentan la enzima telomerasa. La transformación maligna puede observarse cuando fibroblastos primarios o líneas celulares inmortalizadas son tratadas con ciertos virus tumorales como los HR-HPV, o con carcinógenos químicos o físicos. Dichas células transformadas se caracterizan por un crecimiento autónomo, por proliferar sin adherirse necesariamente a una matriz extracelular y por presentar defectos en vías apoptóticas. En el

organismo, cuando se rompe el balance entre la proliferación celular y la apoptosis, se puede facilitar el inicio y el desarrollo de una neoplasia; un aumento descontrolado en los mecanismos de proliferación celular induce el encendido de la maquinaria pro-apoptótica, con lo que el organismo asegura la eliminación de las células transformadas, por lo cual mutaciones que bloquean la muerte celular, asociada con una proliferación sin control, promueven el desarrollo del cáncer. En células normales, si el DNA celular sufre algún daño por un compuesto cancerígeno, el ciclo celular se detiene hasta que se repare el daño; si el daño al DNA es muy grande y no se puede reparar, la célula sufre apoptosis. El descontrol del ciclo celular y la resistencia a la apoptosis observada en ciertos tipos de células tumorales parecen ser factores que se relacionan con la inestabilidad genética, con la resistencia a las drogas quimioterapéuticas y en parte con el crecimiento del tumor.

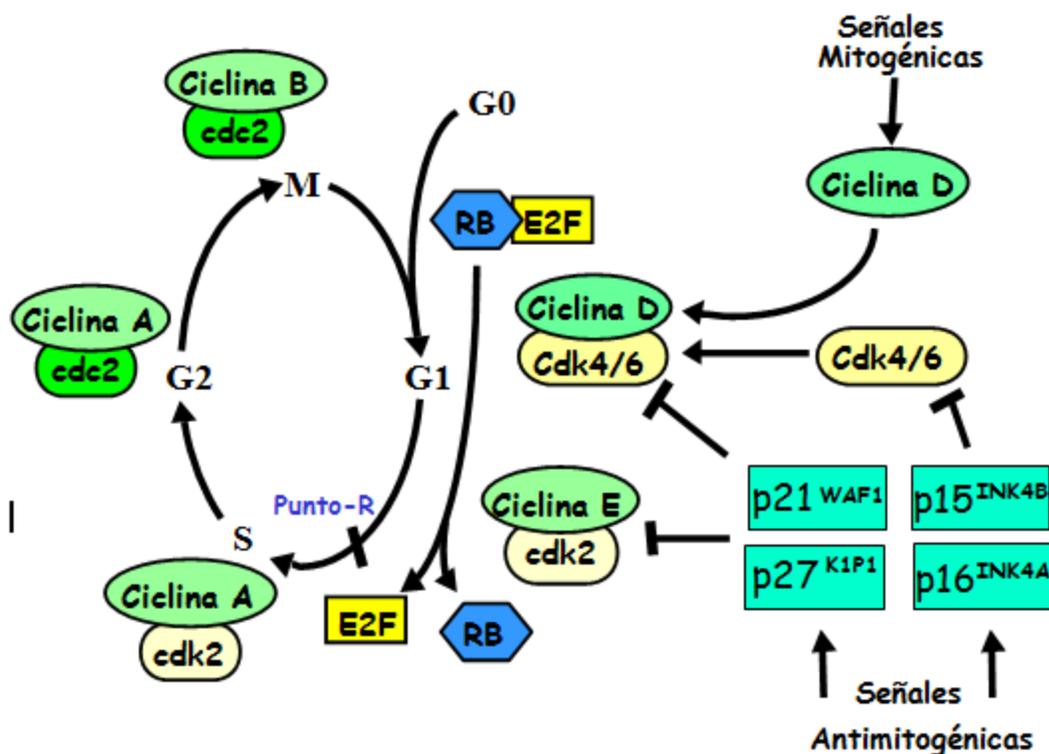


Fig. 1. Control del Ciclo Celular. G0, G1, S, G2 y M: fases de reposo, intervalo 1, síntesis de DNA, intervalo 2 y mitosis, respectivamente. R: punto de restricción en el que se bloquea el ciclo celular, en parte debido a la formación de complejos entre Rb y factores de transcripción de la familia E2F. Rb y Rb-P: formas no fosforilada (activa) e hiperfosforilada (inactiva) de la proteína retinoblastoma. Para que el ciclo celular pueda avanzar es necesario que se fosforile Rb y se liberen proteínas de la familia E2F. La fosforilación de Rb se da inicialmente por el complejo ciclina D/Cdk 4/6 y luego por ciclina E/Cdk2. La actividad de estos complejos depende de señales mitogénicas (regulación positiva) y de proteínas inhibitorias (regulación negativa) tales como p15, p16, p21 y p27. La familia de factores de transcripción E2F activa la expresión de genes necesarios para que avance el ciclo celular.

Otra característica importante de las células cancerosas es su inestabilidad genómica y su heterogeneidad cromosómica dentro del tumor. Las células tumorales frecuentemente se apartan del cariotipo diploide normal o euploide transformándose en anormal o aneuploide por pérdida o ganancia de cromosomas. Además, en las células cancerosas pueden observarse deleciones o translocaciones recíprocas de fragmentos cromosómicos, segmentos de DNA que se amplifican selectivamente dentro de algún cromosoma, o bien se replican en forma independiente del cromosoma. La amplificación de segmentos de DNA de algún cromosoma

puede aumentar el número de copias de protooncogenes o de otros genes de interés terapéutico tales como *mdr* (del inglés multi drug resistance) localizados en estos segmentos; las translocaciones cromosómicas pueden activar protooncogenes y las pérdidas de regiones cromosómicas o de todo un cromosoma pueden eliminar antioncogenes. Como veremos más adelante, en CaCu son frecuentes las alteraciones cromosómicas. Un defecto en las enzimas encargadas de la replicación del DNA, de la reparación del daño al DNA o en las proteínas del aparato mitótico encargadas de la distribución correcta de los cromosomas en las células hijas favorece la inestabilidad de los cromosomas. Asimismo, un defecto en los puntos de control del ciclo celular, los cuales aseguran normalmente que la división celular no ocurra hasta que termine la replicación del DNA y se repare cualquier región dañada, conlleva a la inestabilidad cromosómica y genética observada en las células cancerosas.

Una de las características principales de la transformación celular es la inhibición del proceso de diferenciación; durante la diferenciación, las células pierden su capacidad proliferativa y se especializan en funciones determinadas. Las anormalidades en el proceso de diferenciación celular que se observan en los tumores malignos pueden deberse tanto a mutaciones que inducen el crecimiento celular, por ejemplo en oncogenes y en genes supresores de tumor, como a mutaciones de genes que en forma normal están regulando el mecanismo de diferenciación celular.

En conclusión, el crecimiento de un tumor maligno es un proceso en el que una sucesión de cambios genéticos y epigenéticos dentro de la población de células tumorales lleva a la aparición y evolución de células cada vez más malignas, las cuales no son capaces de regular negativamente el ciclo celular, crecen sin control, son resistentes a la apoptosis, presentan inestabilidad genómica y fallas en sus mecanismos de diferenciación.

Protooncogenes y oncogenes

El descubrimiento de los protooncogenes (genes normales) y de los oncogenes (versiones alteradas) ha permitido explicar el cáncer a nivel molecular. Los protooncogenes desempeñan funciones importantes para el crecimiento y proliferación celular. Codifican para factores de crecimiento, receptores a dichos factores, transductores de señales y proteínas nucleares que actúan como factores de replicación o de transcripción. Por ejemplo, las proteínas de la familia Ras se localizan en la membrana citoplasmática y participan en transducción de señales mitogénicas; por otro lado, la proteína protooncogénica Myc se localiza en el núcleo y participa en regulación de la transcripción de muchos genes. Se conocen alrededor de 100 protooncogenes y sería difícil mencionar las características de cada uno de ellos en este momento. Sin embargo, por su importancia en proliferación, diferenciación y apoptosis se mencionarán algunas propiedades de *c-myc*, *ras* y *bcl-2*.

(A) *c-myc*. La expresión del gen *c-myc* depende de factores de crecimiento y aumenta con la entrada de las células al ciclo celular, sugiriendo que la expresión de este gen puede ser un componente de la proliferación celular normal. La proteína Myc interacciona con varias proteínas (tales como Max) para modular la transcripción de algunos genes. Se ha determinado que una sobreexpresión de Myc lleva al cambio de los homodímeros Max-Max a heterodímeros Myc-Max, cambiando una represión génica en una activación (Fig. 2). La proteína *c-Myc* puede también inhibir la expresión de varios genes y se ha sugerido que esta actividad es importante para su función. Además de participar en la transcripción de genes que controlan el crecimiento celular, se ha determinado que *c-myc* induce apoptosis en fibroblastos deprivados de suero o en otras células que están bloqueadas en proliferación por agentes químicos o por citocinas antiproliferativas. Esto implica que cuando en una célula se genera una mutación que active *c-myc*, se establece una presión selectiva para que se introduzca una segunda mutación que inhiba apoptosis y la lesión avance hacia neoplasia. Para que Myc induzca apoptosis requiere de la interacción con Max. También, se ha demostrado que la inducción de la apoptosis por *c-Myc*

requiere de la vía Fas/CD95. La inducción de la apoptosis por c-Myc puede deberse en parte a la activación que esta proteína oncogénica ejerce sobre la expresión de p53. Aquí es importante señalar que la proteína p19Arf regula un punto de control que protege a las células de señales oncogénicas hiperproliferativas (en este caso c-Myc activada), induciendo la apoptosis dependiente de p53.

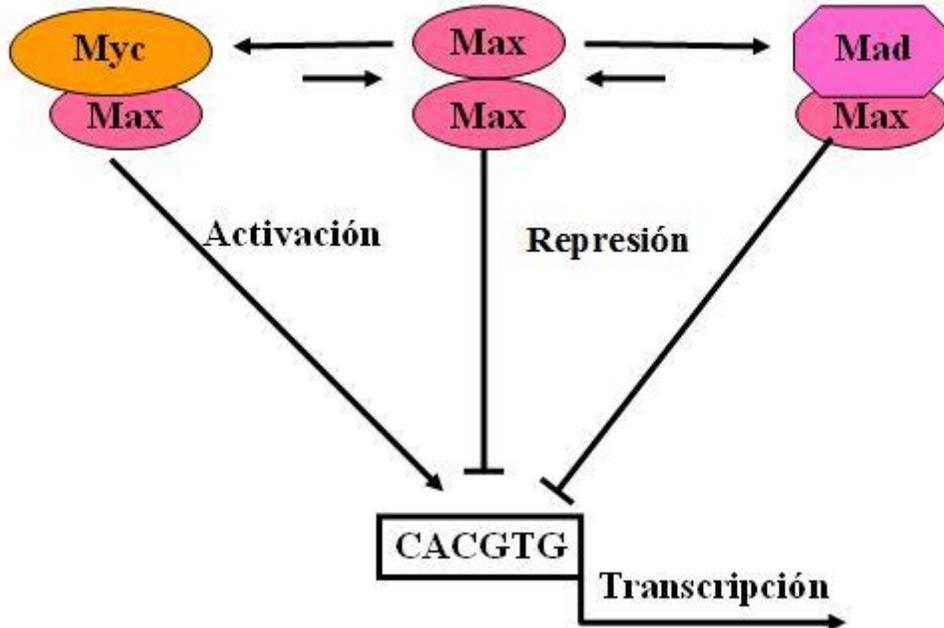


Figura. 2. Regulación transcripcional causada por el homodímero Max-Max y el heterodímero Myc-Max. La concentración de proteína Max no varía en las distintas etapas del ciclo celular y los homodímeros Max-Max son inhibidores transcripcionales. Cuando algún factor de crecimiento produce aumento en la concentración intracelular de Myc, se favorece la formación de heterodímeros Myc-Max y se activan genes importantes en crecimiento y proliferación celular.

Es posible que Myc tenga efectos proapoptóticos directos, independientes de su función como factor transcripcional. Un interesante estudio demostró que Myc favorece la disociación del citocromo C de la mitocondria (4). El balance entre proliferación y apoptosis en la carcinogénesis inducida por *myc* reviste gran importancia básica y clínica ya que este gen se encuentra alterado en varios cánceres humanos. Dada la enorme importancia de Myc en el desarrollo de cáncer, en este momento varios laboratorios trabajan intensamente con el fin de seguir entendiendo los mecanismos que regulan su función como factor de transcripción, en particular lo referente a interacciones con otras proteínas, genes blanco y diseño de drogas para abatir su expresión o su función (5-8).

(B) *ras*. Otro oncogen muy importante en el desarrollo del cáncer humano es *ras*. Desde hace varios años se sabe que la proteína Ras actúa como transductor de señales del exterior al interior de la célula. La activación de receptores con actividad de tirosina cinasa, tales como aquellos para el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la insulina o el factor de crecimiento neuronal (NGF), transforma el complejo inactivo de GDP-Ras en el complejo activo GTP-Ras. Esta activación es precedida de la autofosforilación del receptor y de la asociación del receptor fosforilado con proteínas del citoplasma (proteína adaptadora Grb 2 y el factor de intercambio de nucleótidos Sos; (Fig. 3). Otras proteínas reguladoras además de Sos, que favorecen el reemplazo de GDP unido a Ras por GTP, son las activadoras de GTPasas que estimulan la hidrólisis del GTP unido a Ras.

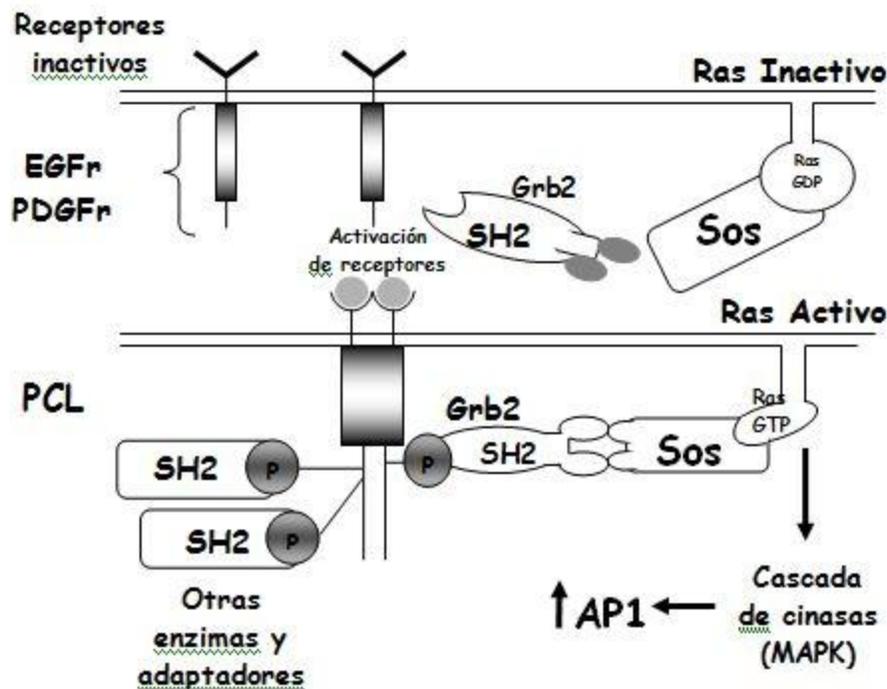


Figura. 3. Transducción de señales de receptores a factores de crecimiento, mediada por la proteína protooncogénica Ras. Diversos receptores a factores involucrados en el crecimiento celular (como el receptor al factor de crecimiento epitelial o EGF, o el receptor al factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF) pueden autofosforilarse después de la unión específica con el ligando; la activación de estos receptores lleva a su vez a la unión de proteínas adaptadoras (Grb2), y por último a la activación de Ras pasando de la forma inactiva ras-GDP a su forma activa ras-GTP. Esta forma es capaz de activar cinasas que envían señales mitogénicas hasta el núcleo celular.

Las señales transmitidas por Ras-GTP aumentan la actividad de moléculas efectoras de Ras, tales como la cinasa Raf específica de serinas y treoninas (Fig. 4). Esta a su vez activa las cinasas MEK1 y 2, las cuales hacen lo mismo con las cinasas ERK1 y 2 (conocidas como MAPKs). Las ERKs fosforilan blancos citoplasmáticos que se translocan al núcleo y finalmente llevan a una estimulación de varios factores de transcripción (incluyendo AP1). La activación de Ras y de la vía Raf-MAPK puede tener efectos positivos o negativos sobre la apoptosis (9), dependiendo del grado de activación. Una estimulación de la vía PI3K/PKB (del inglés phosphatidyl inositol 3kinase/protein kinase B) inhibe consistentemente la apoptosis de diversos tipos celulares (Fig. 4). Se ha demostrado que PKB puede inhibir la apoptosis de células epiteliales y también la inducida en fibroblastos por sobreexpresión de c-Myc. Al parecer Bad y el factor nuclear κ B (NF- κ B) son los sustratos de PKB que median este efecto. Un dato interesante es que PKB se asocia, fosforila e inactiva a IKK (un represor de NF- κ B). Esto lleva a que se active el factor transcripcional antiapoptótico NF- κ B y se transloque al núcleo celular.

Adicionalmente, la forma activa de PI3K, o incluso PKB, pueden fosforilar y activar a NF- κ B. Estos datos definen vías por las cuales actúan diversas cinasas a través de Ras para controlar el crecimiento y la diferenciación celular, así como la apoptosis y están permitiendo el desarrollo de formas más efectivas de terapia del cáncer. Trabajos recientes han resaltado la importancia que desempeñan las alteraciones genómicas y de expresión de los oncogenes ras en cánceres ginecológicos (10), lo cual está permitiendo grandes avances clínicos. Actualmente, como terapia potencial en cáncer, se están usando combinaciones de inhibidores de las vías en las que participan las proteínas Ras (en particular K-Ras, la más frecuentemente mutada en esta familia) (11-13).

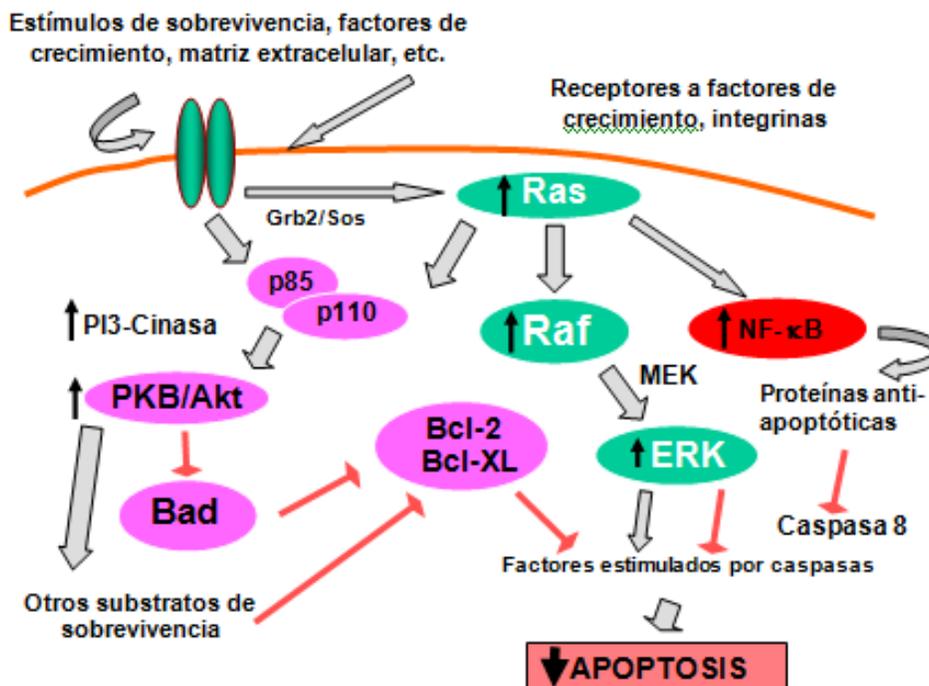


Figura. 4. Regulación de la apoptosis por la proteína oncogénica Ras. Frecuentemente la activación de Ras conduce a una inactivación de proteasas de la familia de las caspasas y a la inhibición de la apoptosis en células susceptibles. Se esquematizan las vías antiapoptóticas más estudiadas: PI3cinasa/PKB; Raf/ERK y la vía NF-κB. En algunas células y bajo ciertas condiciones ERK puede estimular la apoptosis. La proteína Bad es inactivada por fosforilación; en su forma activa (desfosforilada) es un potente inhibidor de la oncoproteína antiapoptótica Bcl-2. Al inactivarse Bad, se reactiva Bcl-2 y disminuye la apoptosis.

(C) *bcl-2*. La familia de proteínas Bcl-2, que está formada por miembros antiapoptóticos (como Bcl-2 y Bcl-XL) y proapoptóticos (como Bax), determina la vida o la muerte de una célula al controlar la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria, tales como citocromo C y AIF (del inglés, apoptosis-inducing factor). Una sobreexpresión del producto del gen *bcl-2* confiere resistencia a la apoptosis en diversos tipos celulares. La liberación del citocromo C causada por altos niveles de proteínas proapoptóticas o por bajos niveles de proteínas antiapoptóticas, lleva a la formación del apoptosoma (Fig. 5). El mecanismo relacionado con la resistencia a la apoptosis incluye al parecer un cambio en el potencial redox de la célula hacia un estado más reducido; este mecanismo está de acuerdo con los estudios que relacionan las etapas iniciales de la apoptosis con la exposición de las células a especies reactivas de oxígeno. Las observaciones anteriores pueden tener gran utilidad en terapia, usando precursores de drogas citotóxicas que requieren condiciones reductoras para activarse (14). La expresión del gen *bcl-2* es abundante en diversos tumores, contribuyendo a la oncogénesis al extender la viabilidad de las células malignas, lo cual favorece la inestabilidad genómica. Dicha sobreexpresión del gen *bcl-2* puede deberse a alteraciones en p53, ya que normalmente *bcl-2* se encuentra reprimido por dicha proteína supresora de tumor. Como vimos antes, la proteína c-Myc induce apoptosis bajo ciertas condiciones, pero esta inducción puede ser suprimida por un exceso de Bcl-2; al parecer el efecto oncogénico cooperador de Bcl-2 sobre c-Myc se debe a la actividad antiapoptótica de Bcl-2. Aquí no debemos olvidar que Myc favorece la liberación del citocromo C de la mitocondria y que Bcl-2 hace lo contrario. Bcl-2 puede también suprimir la apoptosis inducida por

proteínas supresoras de tumor tales como p53 o Bax (15). Lo anterior sugiere que Bcl-2 puede contribuir a la oncogénesis al suprimir la apoptosis inducida por oncogenes o por genes supresores de tumor. También es posible que Bcl-2 tenga una doble función: facilitar la proliferación celular y suprimir la apoptosis.

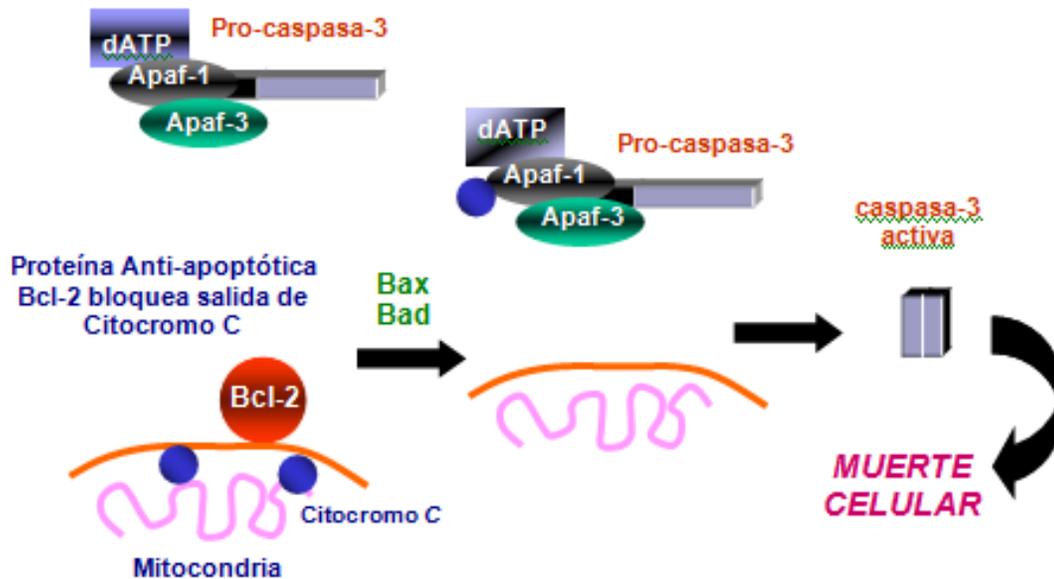


Figura. 5. Vía mitocondrial de apoptosis. Existen varias vías de muerte celular genéticamente programadas en células de mamífero. Proteínas proapoptóticas tales como Bix o Bax pueden regular negativamente a proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o Bcl-XL. Estas últimas impiden la salida del citocromo C de la mitocondria, con lo cual no puede activarse el apoptosoma, conteniendo Apaf-1, Apaf-3 y procaspasa-3. Lo anterior lleva a inhibición de la apoptosis dependiente de la mitocondria.

Existen excelentes revisiones en las que se describen estrategias interesantes para inhibir la familia bcl-2 de genes supresores de la apoptosis en cáncer (16-19).

Genes supresores de tumores

La fusión entre células normales y tumorales indica la existencia de genes que regulan negativamente el crecimiento celular. La célula híbrida pierde el carácter tumoral, sugiriendo que a la célula neoplásica le falta un gen regulador del crecimiento y que es posible recuperar dicho control al fusionarla con una célula normal. Como se mencionó anteriormente, estos genes de regulación negativa del crecimiento se llaman genes supresores de tumores y los más estudiados en este momento son el gen retinoblastoma (*rb*), el gen *p53* y el gen que codifica para TGF β . Además de la reconocida importancia de las proteínas codificadas por estos genes en el control negativo del ciclo celular, se ha reportado que estas proteínas participan activamente en apoptosis. En los últimos años se ha encontrado que la expresión de estos genes disminuye a medida que avanza el desarrollo de un tumor maligno y que esta disminución se debe a mecanismos epigenéticos, tales como metilación de la región promotora o desacetilación de histonas cercanas al sitio en que inicia la transcripción.

(A) *Rb*. El producto del gen *rb* es una fosfoproteína nuclear de 105 a 110 kDa (conocida como pRb o Rb) que controla negativamente el ciclo celular al unirse e inactivar factores de transcripción tales como E2F, los cuales controlan la expresión de numerosos genes involucrados en proliferación celular y apoptosis (Fig. 1). La actividad de pRb es inhibida

mediante fosforilación inducida por Cdks. Además de inhibir el ciclo celular, pRb favorece la diferenciación de las células en tejidos del adulto y durante el desarrollo embrionario. Se ha observado también que puede aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales, disminuir la angiogénesis y suprimir la invasividad del tumor. Sin embargo, contrario a lo que se espera del producto de un gen supresor de tumor, pRb es una proteína antiapoptótica, debido en parte al bloqueo de E2F-1 (20).

Sabemos que las células requieren de estimulación por factores de crecimiento sólo durante las dos terceras partes de su fase G1; posteriormente ellas pueden completar el ciclo de crecimiento y llegar a la mitosis en ausencia de mitógenos. Este comportamiento sugiere la existencia de un punto de decisión al final de la fase G1, el cual se ha llamado Punto de Restricción (Punto R) y está estrechamente controlado por pRb. Los mitógenos rápidamente inducen la expresión de ciclina D1 que se asocia y activa a las cinasas Cdk4/Cdk6, lo cual lleva a fosforilación e inactivación parcial de pRb. Posteriormente se induce la síntesis de ciclina E, la cual forma el complejo ciclina E/Cdk2 y causa una hiperfosforilación e inactivación de pRb, con lo que puede avanzar el ciclo celular (Fig. 1). La inducción de ciclina D1 dependiente de mitógenos es frecuentemente mediada por la cascada de transducción de señales Receptor (tirosina cinasa)-Ras-Raf-MAP cinasas. Los mitógenos inducen además la síntesis de la proteína Myc, la cual aumenta la síntesis de la fosfatasa cdc25A que activa Cdks al remover grupos fosfato que normalmente inhiben su actividad (21). Las alteraciones que activan esta vía de señales inducida por mitógenos y que llevan a inhibición de pRb, son frecuentes en cáncer humano. Por ejemplo, muchas células tumorales liberan factores mitogénicos, otras activan receptores (EGFr, Her2/Neu) a dichos factores, en 30-40% de los tumores humanos la proteína Ras está mutada y activada, la sobreexpresión de ciclina D es frecuente en células tumorales, así como las mutaciones que inactivan a pRb. Incluso la cascada de señales relacionada con TGF β también puede modificar los niveles de fosforilación de pRb a través del inhibidor de Cdks conocido como p15. En células epiteliales normales TGF β inhibe el crecimiento celular (induce niveles altos de p15), pero algunas células tumorales no expresan receptores para TGF β , otras expresan receptores mutantes o algún componente defectuoso de esta cascada de señales inhibitorias del crecimiento celular, por lo cual no se sobreexpresa p15. En este caso (niveles bajos de p15), la proteína pRb es fosforilada (inactivada), el factor transcripcional E2F es liberado y el ciclo celular puede progresar. De gran interés ha sido determinar que el complejo E2F-pRb puede activar o reprimir genes de acuerdo con los cofactores que se asocian a este complejo. En un interesante ejemplo de regulación epigenética la proteína pRb se une a histona desacetilasas (HDAC del inglés histone deacetylase), las cuales compactan la cromatina, favorecen la interacción de los nucleosomas con regiones promotoras y bloquean la transcripción. Por otro lado, se ha demostrado que E2F interacciona con histona acetil transferasas (HAT del inglés histone acetylase) tales como p300/CBP o p/CAF, lo cual puede inducir la transcripción de algunos genes necesarios para el crecimiento y proliferación de las células. El balance entre estos corepresores y coactivadores puede influir en el bloqueo o el avance del ciclo celular.

La pérdida de función del gen *rb* se ha relacionado con la progresión de varios cánceres humanos comunes, tales como vejiga, pulmón, próstata y mamario. Sin embargo, si se reemplaza el gen *rb* defectuoso en células tumorales obtenidas de distintos tipos de neoplasias por el gen *rb* normal, estas células pierden su actividad tumorigénica. Esta observación, junto con reportes recientes, sugiere la posibilidad de revertir el fenotipo maligno mediante la corrección de defectos en un gen supresor de tumor en cánceres que presentan múltiples alteraciones genéticas, lo cual representa una esperanza en el campo de la terapia génica del cáncer. Adicionalmente, se ha reportado que una forma de pRb sin el extremo N-terminal (112 aminoácidos ausentes), llamada pRb⁹⁴, presenta una velocidad de recambio bastante menor que pRb silvestre y la tendencia a permanecer en su forma activa hipofosforilada en las células tumorales. Lo interesante es que esta proteína ejerce una actividad supresora de tumor más potente comparada con pRb de tamaño normal (110 kDa) (22) y por lo tanto representa un buen candidato para los protocolos de terapia génica del cáncer. Otros candidatos para estos

protocolos serían mutantes de pRb que posean una actividad antiapoptótica reducida, sin cambiar sus propiedades supresoras de tumor.

Por otro lado, E2F-1 es el único miembro de la familia de factores E2F que puede inducir apoptosis y proliferación celular, es decir, puede actuar como gen supresor de tumor y como oncogen, respectivamente. Por la importancia de la vía pRb-E2F en el control del crecimiento, varios laboratorios la han tomado en cuenta en el diseño de protocolos de terapia génica del cáncer. Uno de los aspectos más interesantes relacionados con pRb es que esta proteína regula la transcripción de genes importantes en diferenciación (23-25), lo cual está permitiendo nuevas estrategias terapéuticas (26).

(B) *p53*. El gen supresor de tumor *p53* está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y contiene 11 exones que codifican para 393 aminoácidos. Se le ha clasificado como supresor de tumor ya que puede detener el crecimiento descontrolado de una célula transformada, o bien favorecer la apoptosis de dichas células. La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear capaz de reconocer una secuencia específica del DNA y actuar como factor de transcripción. Una propiedad importante de las proteínas virales oncogénicas, como el antígeno T grande codificado por SV40, la oncoproteína E1B de adenovirus y la proteína E6 de los HR-HPV, es la capacidad de unirse con gran afinidad a p53, con lo cual se induce de manera acelerada la degradación de esta proteína supresora de tumor. Se ha demostrado que una inhibición constante de la vía de p53 es un requisito indispensable para mantener el fenotipo proliferativo de células tumorales derivadas de cáncer cervical (27).

La proteína p53 participa en la respuesta celular al daño genético, al menos de 2 formas diferentes: (a) deteniendo el ciclo celular en la fase G1, lo cual permite que se repare el DNA antes de que se replique y (b) induciendo la apoptosis cuando el daño genético ha sido muy importante y ya no se puede reparar (Fig. 6); en este caso la concentración de p53 se mantiene elevada por bastante tiempo, lo cual estimula la expresión del gen proapoptótico *bax* e inhibe la del gen antiapoptótico *bcl-2*. Además, la proteína p53 puede bloquear el ciclo celular entre la fase G2 y M, así como participar directamente en la mantención de la estabilidad genómica. Su función como "guardián del genoma" es inhibida o destruida por deleciones, inserciones y mutaciones puntuales, así como por la formación de complejos inactivos con proteínas endógenas, tales como la oncoproteína Mdm2, o con oncoproteínas virales. Cuando la proteína p53 es inactivada, se inhiben ciertas formas de apoptosis y se permite la proliferación de células defectuosas que favorecen la aparición de una neoplasia. Por ejemplo, ratones "knock-out" que carecen de p53 son muy susceptibles al desarrollo de diversos tumores espontáneos; asimismo, pacientes que presentan el síndrome de LiFraumeni al heredar un alelo mutado de p53, están predispuestos al desarrollo de algún tipo de cáncer. Más del 50% de todos los tumores malignos humanos presentan mutaciones en p53 que se concentran generalmente en 4 regiones de la proteína, las cuales coinciden con las 4 regiones más conservadas entre las especies.

Cuando algún agente genotóxico daña al DNA, la proteína p53 se estabiliza fundamentalmente por fosforilación y acetilación. Debido a esto, la concentración intracelular de p53 aumenta, lo cual induce la detención del ciclo celular y ya sea la reparación del DNA o la apoptosis de la célula (Fig. 6) (28).

En general, este efecto inhibitorio del ciclo celular se debe a la actuación de p53 como regulador transcripcional de un número importante de genes; por ejemplo, p53 induce la expresión de genes relacionados con el control negativo del crecimiento celular, como el gen p21 *waf1/cip1* que codifica un inhibidor de las cdk's de 21 kDa. Se ha observado que la proteína p53 reconoce sitios en los que el DNA está dañado y forma complejos con ellos, con lo cual probablemente se aumente la afinidad de dichos sitios por las proteínas involucradas en la reparación del DNA. La interacción de p53 con el DNA dañado puede además activar la transcripción de genes, tales como *gadd45*, necesarios en la reparación del DNA.

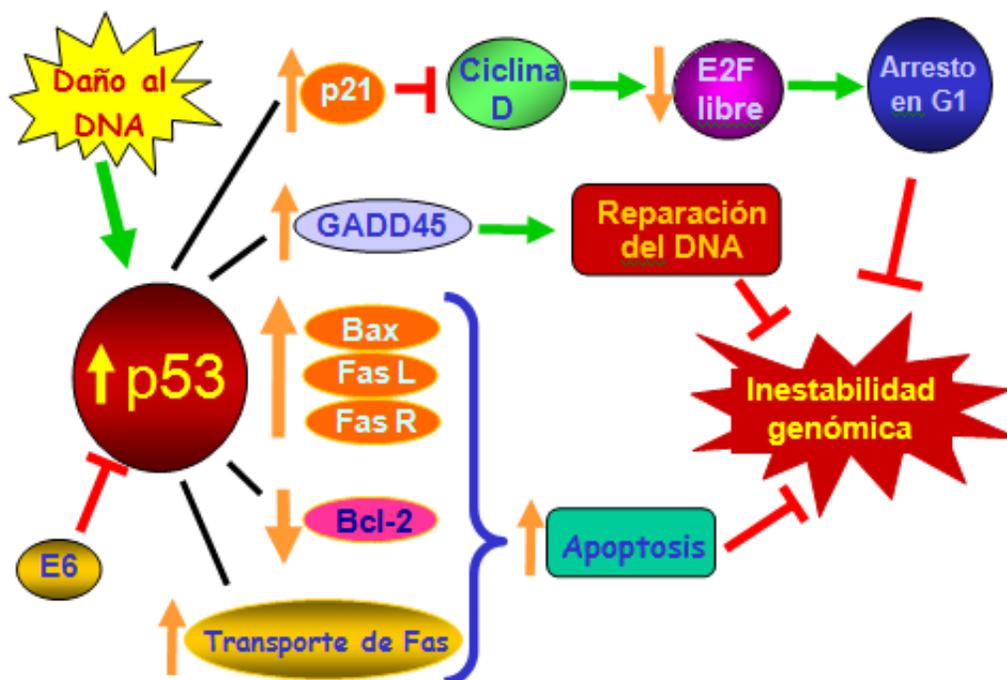


Figura. 6. La proteína antioncogénica p53 favorece la apoptosis. La proteína p53 juega un papel central en la inducción de la apoptosis cuando una célula presenta intenso daño genómico que no puede ser reparado. Actuando como factor transcripcional, p53 activa la expresión de varias proteínas que participan en bloqueo del ciclo celular (p21), reparación del daño genómico (GADD45) o inducción de la apoptosis (Bax, FasL, Fas/CD95). Además, p53 inhibe normalmente la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y favorece el transporte de CD95/Fas del citoplasma a la membrana celular, lo cual favorece la apoptosis. Mutaciones en p53 (o inactivación de p53 por proteínas oncogénicas celulares o virales, como Mdm2 o E6, respectivamente) alteran las respuestas indicadas, llevando a reducción de la apoptosis y a inestabilidad genómica, lo cual favorece el desarrollo de una neoplasia.

La proteína p53 también se puede estabilizar por un mecanismo que involucra el secuestro y destrucción de Mdm-2 por p19Arf (p14Arf en humanos, Fig. 7). Interesantemente, este último mecanismo de estabilización de p53 por acumulación de p19Arf es de gran importancia en cáncer (29, 30) ya que el estrés oncogénico lleva a la sobreexpresión de p19Arf (Fig. 7). En conclusión, p53 es un factor transcripcional muy importante tanto para la regulación negativa del ciclo celular como para activar mecanismos de apoptosis; su ausencia o funcionamiento deficiente favorece el desarrollo del cáncer. La posibilidad de diseñar métodos exitosos de terapia génica empleando genes supresores de tumor tales como *rb* o *p53* es de enorme importancia en medicina. Como hemos visto p53 juega un papel crucial en el desarrollo del cáncer, lo cual ha sugerido estrategias terapéuticas interesantes basadas en recuperar ya sea sus funciones como factor de transcripción o la actividad de genes y proteínas reguladas por este importante supresor de tumores (31-36).

Doble papel del TGFβ en tumorigénesis

Los miembros de la familia TGF β tienen tanto actividad supresora de tumor como actividad oncogénica. En tejidos normales, el producto de los genes TGF β , presenta una actividad supresora del crecimiento celular, sin embargo durante la tumorigénesis existe un predominio de su actividad oncogénica (37). Esto es debido en parte, a cambios en la expresión de TGF β o de la respuesta celular que incluye, entre otros, cambios en los factores de transcripción Smad o en los receptores para TGF β . TGF β ejerce sus efectos al interactuar con receptores específicos de tipo I (T β RI) y de tipo II (T β RII) ubicados en la superficie celular (38). La unión del TGF β al T β RII favorece la formación de un complejo entre el receptor T β RI y el T β RII que conlleva a la fosforilación y activación de T β RI por T β RII. La activación de T β RI induce una propagación de señales supresoras de tumor a través de la fosforilación de Smad 2 y Smad 3. Por otro lado, Smad 7 antagoniza las señales de Smad 2 y Smad 3 al interactuar con T β RI e inhibir la fosforilación y activación de Smad 2 y 3. TGF β induce la expresión de Smad 7 para retroinhibir la intensidad y duración de la respuesta al TGF β .

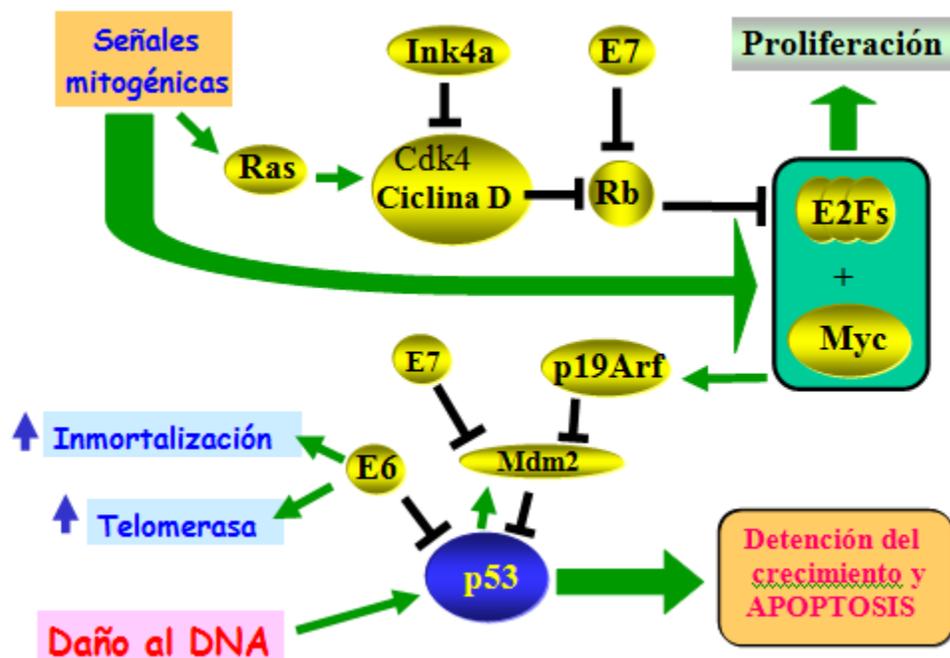


Figura. 7. La proteína p19Arf es inducida por oncogenes y estabiliza a p53. La decisión celular entre proliferación y apoptosis está controlada por proteínas tales como p19Arf (equivalente a p14Arf en humanos). Esta proteína secuestra a Mdm2 que normalmente facilita la destrucción de p53; es decir, p19Arf aumenta la vida media y la actividad de p53. A su vez, la expresión de p19Arf es inducida por oncogenes como myc, ras o incluso E2F. Así, una oncoproteína como c-Myc favorece la apoptosis en células que tienen p53 silvestre, pero transforma células que poseen mutaciones en p53. Se indica además el efecto inhibitorio de E6 sobre p53 y de E7 sobre Mdm2 y sobre pRb.

Aunque la vía de los factores Smad ha sido muy estudiada, recientemente se ha visto que otras vías de transducción de señales activadas por TGF β son igualmente importantes; por ejemplo, la vía que involucra proteínquinas activadas por mitógenos (MAPKs) o la vía en que interviene la fosfoinositol-3 cinasa (PI3K).

La actividad supresora de tumor de TGF β deriva en parte de su capacidad para inhibir el crecimiento de células epiteliales y linfoides, de las cuales se origina la mayoría de los cánceres humanos. La regulación negativa de c-myc dependiente de TGF β es muy importante para

entender el mecanismo inhibitorio de la proliferación celular inducido por TGF β . Esta represión se explica por la unión de complejos Smad a un elemento en el promotor de c-myc inhibible por TGF β (39). Además, TGF β regula positivamente la expresión de p15 y de p21 (inhibidores de cinasas dependientes de ciclina), lo cual ocurre en forma directa por activación transcripcional dependiente de Smad y en forma indirecta al bloquearse la represión de estos genes causada por la proteína c-Myc (Fig. 8). Es importante señalar que la proteína p15 no sólo es un potente inhibidor de Cdk 4/6 sino que además compite y libera a p27 del complejo Ciclina D-Cdk 4/6, formándose ahora el complejo inactivo p27-Ciclina E-Cdk2 (Fig. 8).

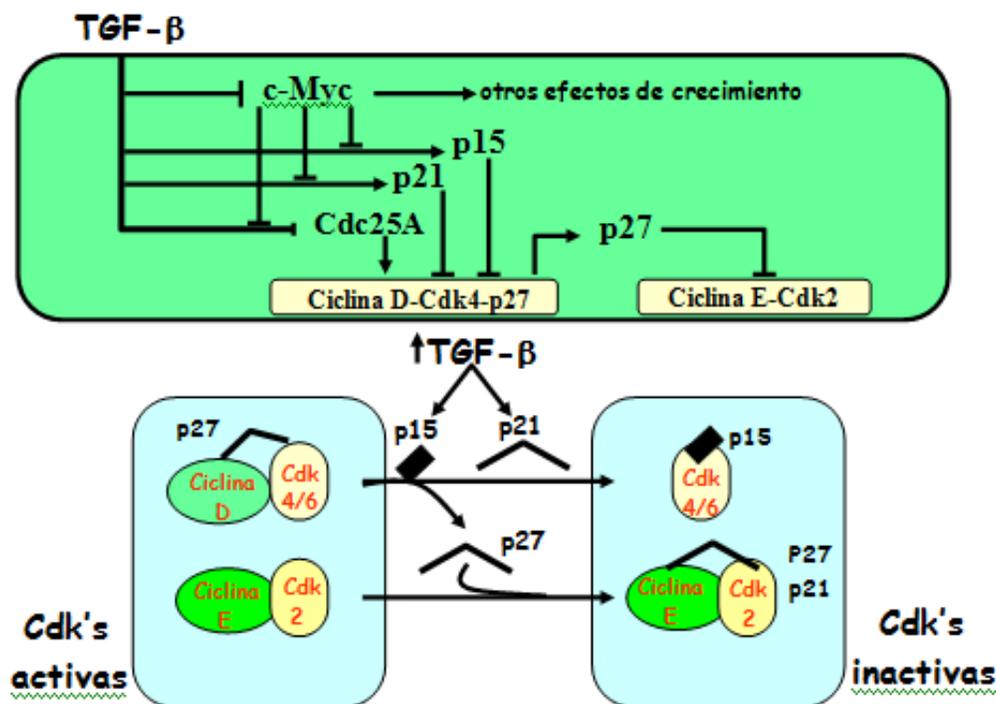


Figura. 8. TGF β actúa como una proteína antioncogénica al bloquear el ciclo celular. El TGF β induce 2 tipos de respuestas antiproliferativas: (a) regulación negativa de la expresión de c-myc; (b) inhibición de Cdk's debido a la inducción de p15 y p21, así como por regulación negativa de la fosfatasa Cdc25A. La proteína c-Myc antagoniza las señales de TGF- β al actuar como represor de p15 y p21, así como al eliminar el bloqueo sobre Cdc25A. Por esto, la inhibición de c-myc es necesaria para que el TGF- β cause un bloqueo del ciclo celular. La unión de la proteína p15 al complejo Ciclina D-Cdk4 lleva al desplazamiento de p27 del complejo activo Ciclina D-Cdk4-p27 al complejo Ciclina E-Cdk2, causando una fuerte inhibición de este último.

Dependiendo del tipo celular, TGF β es requerido para mantener la estabilidad del genoma, para inducir senescencia replicativa, para suprimir la actividad de telomerasa y para inhibir angiogénesis. Cuando la función del receptor T β RII disminuye, las respuestas inhibitorias del crecimiento se pierden en forma selectiva, en tanto que los efectos oncogénicos se ponen en evidencia. Entre estos, podemos citar el aumento en invasión del mesénquima por células epiteliales al inducirse una transición epitelio-mesénquima. Esto sugiere que el nivel de activación de T β RII puede alterar el resultado de la señalización por TGF β desde la supresión del crecimiento celular hasta la oncogénesis. Al parecer las vías MAPK, PI3K o RhoA son muy importantes para las actividades proto-oncogénicas de TGF β . Datos recientes sugieren que la activación de la vía MAPK puede jugar un papel importante para llevar la respuesta a TGF β hacia un resultado oncogénico y que TGF β y Ras activado pueden cooperar para promover

invasión y metástasis. También se observó que Raf, un miembro de la vía de señalización Ras-MAPK, induce la producción de TGF β al mismo tiempo que bloquea su respuesta apoptótica, pero no su respuesta invasora, lo cual aumenta la malignidad de las células epiteliales.

Apoyando las observaciones anteriores, en queratinocitos se ha determinado que la estimulación de la invasión causada por TGF β depende de la vía Ras/MAPK/MEK. La inducción de la transición epitelio-mesénquima puede requerir de la cooperación entre las vías MAPK y Smad o puede ser independiente de Smad y utilizar la vía RhoA y PI3K/Akt. La activación de Ras aumenta la degradación de Smad 4 por la vía de la ubiquitina-proteosoma, lo cual lleva a progresión de carcinomas indiferenciados.

Desde el punto de vista del TGF β , las estrategias terapéuticas deberían aumentar la función de esta importante molécula como supresor de tumor y bloquear sus efectos oncogénicos. Dado que muchos tumores epiteliales presentan una disminución en la expresión de T β RII en etapas tempranas de su desarrollo, se sugiere que el restablecimiento de los niveles de T β RII es una buena estrategia terapéutica. Respecto a esto, se han encontrado varias moléculas pequeñas que aumentan la expresión de T β RII. Los inhibidores de la enzima farnesil transferasa son particularmente interesantes ya que no sólo incrementan los niveles de T β RII sino que además inhiben la vía Ras (40). Es evidente que en los próximos años veremos un avance notable en relación a los mecanismos moleculares que permiten a TGF β actuar como supresor de tumores (41).

Carcinogénesis en etapas múltiples

Como hemos visto, el desarrollo de una neoplasia en humanos es un proceso complejo de etapas múltiples que convierte en forma gradual una célula normal en una maligna, la cual presenta defectos tanto en los mecanismos de apoptosis como en aquellos que controlan su proliferación. Se acepta cada vez más que el cáncer se desarrolla en un proceso evolutivo que está conducido por mutaciones de genes celulares seguido de selección clonal de la progenie variante presentando propiedades de crecimiento cada vez más agresivas y que responde menos a los diversos esquemas terapéuticos.

La epidemiología ha ofrecido evidencias importantes sobre el desarrollo del cáncer en etapas; cada etapa histopatológica en el desarrollo de un carcinoma requiere de varios años y el proceso total entre la lesión inicial y la aparición del tumor puede tomar largo tiempo. Esto ha permitido identificar diferentes etapas a lo largo de este proceso. Una de las primeras observaciones que llevó al concepto del desarrollo del cáncer en etapas múltiples, se logró con virus que poseen oncogenes en su genoma tales como polioma, SV40 y HPV. Cada oncogén viral se especializa para inducir una parte de los fenotipos requeridos en la transformación maligna total. Este concepto fue luego extendido a un buen número de los oncogenes de origen celular. En tumores de piel inducidos experimentalmente en ratones tratados por agentes iniciadores y agentes promotores, se ha sugerido que varias alteraciones genéticas son necesarias para convertir queratinocitos normales en células capaces de formar carcinomas epiteliales escamosos.

Una demostración más directa de la importancia de las mutaciones en múltiples genes en carcinogénesis ha sido obtenida usando oncogenes clonados. De suma importancia han sido los experimentos que revelaron que ciertos pares de oncogenes (tales como *ras* y *myc*) podían colaborar eficientemente en la transformación celular. En estos experimentos, ni el oncogén *ras* ni *myc* por separado son capaces de inducir una transformación completa. Como hemos mencionado, la proteína c-Myc favorece proliferación y apoptosis y la proteína Ras se encargaría de inhibir este último proceso favoreciendo la transformación maligna. Esto sugiere que ciertos pasos en tumorigénesis pueden representar mutaciones sucesivas de algunos protooncogenes.

En modelos transgénicos de carcinogénesis, también se ha observado la cooperación entre oncogenes; por ejemplo, ratones transgénicos para *c-myc* bajo el control del promotor del MMTV (del inglés mouse mammary tumor virus) produjeron sólo algunos tumores mamarios que pudieron ser detectados cuando los ratones tenían más de 3-4 meses de edad, a pesar de que el gen *c-myc* se expresó abundantemente en todas las células del epitelio mamario, produciendo incluso frecuentes regiones hiperplásicas. No hay duda que el gen *c-myc*, a pesar de predisponer este tejido al desarrollo de neoplasia, no puede por sí solo causar cáncer mamario. Cuando ratones transgénicos para MMTV-*myc* se cruzan con ratones transgénicos para MMTV-*ras*, los descendientes presentan formación de tumores a mayor velocidad y frecuencia, comparada con los padres. Este experimento sugiere nuevamente que las actividades complementarias de 2 oncogenes diferentes cooperan para crear células tumorigénicas. Es posible que uno de los genes cooperadores active el ciclo celular y el otro inhiba los procesos apoptóticos. El descubrimiento de la colaboración entre oncogenes ayuda a entender el mecanismo de la carcinogénesis en etapas múltiples. Basándonos en dicha colaboración, debemos pensar que cada paso en el proceso de tumorigénesis refleja una mutación que lleva a la activación de uno u otro oncogén celular, o a la inactivación de genes supresores de tumor. Estos genes supresores de tumor también juegan un importante papel en el desarrollo en etapas múltiples, de un carcinoma. Por ejemplo, ratones "knock out" para *p53* (o sea que ambos alelos del gen *p53* son defectuosos) presentan diversos tipos de tumores a edad temprana. Existen varias explicaciones para la cooperación entre oncogenes; por ejemplo, oncogenes como *ras* inducen transformación morfológica e independencia de anclaje, pero no afectan el proceso de immortalización celular. Por el contrario, oncogenes como *c-myc* no inducen independencia de anclaje pero llevan a immortalización. Los genes que funcionan como *ras* (colaborando con *myc*) codifican proteínas citoplasmáticas, en tanto que aquellos que funcionan como *myc* (colaborando con *ras*) codifican proteínas nucleares. Esto sugiere que una parte del desarrollo del proceso maligno tiene que ver con fenómenos que ocurren en el citoplasma y otra parte con eventos nucleares. Otro modelo fisiológico alternativo de colaboración entre oncogenes se relaciona con apoptosis; por ejemplo, se ha determinado que varios oncogenes, incluyendo *c-myc*, el oncogén E7 de HR-HPV y E1A, favorecen la apoptosis, lo cual implicaría un efecto contrario al crecimiento tumoral; sin embargo, en presencia de un segundo oncogén (como *ras* o como el oncogén E6 de HPV) se revierte la tendencia hacia apoptosis. Es decir, la cooperación entre oncogenes llevaría tanto a un aumento en proliferación como a una disminución en apoptosis.

Evidencia a favor del modelo de carcinogénesis en etapas múltiples ha sido obtenida en humanos, mediante análisis genético de poblaciones celulares premalignas y malignas en cáncer de colon (42). En el desarrollo de este carcinoma (y probablemente en cualquier neoplasia) participan varios oncogenes y antioncogenes. De gran importancia en la progresión tumoral en etapas múltiples es la inactivación tanto de la vía bloqueada por *pRb* como de la vía en que participa *p53*. Las alteraciones genéticas iniciales que sufre una célula en camino a una transformación maligna y que la hacen independiente de mitógenos y señales inhibitoras del crecimiento, la deberían llevar a apoptosis o a senescencia celular prematura. La senescencia celular la podemos definir como el programa fisiológico de detención terminal del crecimiento celular, es decir, la detención permanente de la división celular. Recientemente, se ha sugerido que la senescencia celular es un mecanismo importante de defensa contra el cáncer *in vivo* (43, 44). Es posible que sin los mecanismos de senescencia celular, el cáncer sería inevitable para todos los individuos a medida que envejecen. Respecto a las mencionadas alteraciones genéticas iniciales podemos mencionar que la activación del oncogén *myc* favorece apoptosis y la activación de *ras* lleva a senescencia; esto último sugiere que la inmortalidad de las células es un prerequisite para la transformación por el oncogén *ras*. El mecanismo de senescencia está muy ligado a las acciones de los inhibidores de las Cdks, en particular a *p16Ink4a* y a *p21*, los cuales se relacionan en una vía de regulación común que posee el locus genético (*p16Ink4a/p19Arf*). Este locus codifica 2 importantes proteínas supresoras de tumor: *p16Ink4a* y *p19Arf* (*p14Arf* en humanos). La proteína *p16* es un potente inhibidor de *Cdk4* y *Cdk6*, lo cual lleva a un bloqueo en el ciclo celular por activación de *pRb*. La proteína *p19Arf* es codificada por

un diferente marco de lectura del mencionado locus genético, degrada a la proteína oncogénica Mdm2 y neutraliza la inhibición de p53 causada por Mdm2 (Fig. 7) (45). Esto último también causa un bloqueo en el ciclo celular ya que p53 promueve la síntesis de p21, un potente inhibidor de las Cdks. En otras palabras, las deleciones del locus antioncogénico p16/p19 (p16/p14), observadas frecuentemente en tumores humanos, causan la pérdida simultánea de la actividad de pRb y de p53. La pérdida de p53 lleva a una disminución de senescencia inducida por p21 y de apoptosis (aumenta la expresión de Bcl-2 y disminuye la de Bax). Es decir, las mutaciones en la vía de pRb ejercen una fuerte presión selectiva para que deba mutarse la vía relacionada con p53 y la célula pueda alcanzar un estado de transformación maligna. Vale la pena recordar en este momento que los virus oncogénicos poseen una forma rápida y eficiente de inactivar tanto p53 como pRb para inmortalizar queratinocitos primarios.

Una disminución de la apoptosis o la inmortalización celular podrían ser tan importantes para la progresión tumoral como lo es la inactivación de genes relacionados con la estabilidad genómica. Más de 90% de las células cancerosas estudiadas hasta ahora logran la inmortalización mediante la inducción de telomerasa, enzima capaz de mantener el largo de los telómeros que normalmente se acortan durante la replicación del DNA; en presencia de telomerasa las células cancerosas son capaces de mantener el largo de los telómeros asegurando la integridad de los cromosomas, con lo que evitan la crisis y la muerte celular (o sea, alcanzan un fenotipo inmortal). Al parecer la represión del gen de telomerasa en células normales y su activación durante las etapas tardías de la tumorigénesis podría representar un paso importante en carcinogénesis. Apoyando esta idea se ha encontrado que una sobreexpresión de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) y de H-ras, junto con el antígeno T grande de SV40, lleva a la conversión tumorigénica tanto de fibroblastos como de células epiteliales humanas. Estos resultados indican que un aumento en la actividad de ras y telomerasa en conjunto con la inhibición de p53 y pRb causada por el antígeno T de SV40, son suficientes para crear una célula cancerosa humana (46). Dado que la mayoría de las neoplasias expresan telomerasa, con lo cual se estabiliza el largo de los telómeros, se ha observado que la inhibición de esta enzima limita el crecimiento tumoral, lo cual puede ser una magnífica estrategia en la terapia del cáncer humano (46).

Como vimos antes, la angiogénesis mediada por VEGF se asocia con inhibición de la apoptosis y juega un papel crucial durante el crecimiento tumoral en etapas múltiples. Las células malignas secretan factores angiogénicos que activan a las células endoteliales de los tejidos vecinos e inducen la formación de nuevos capilares dentro del tejido tumoral. Es posible que la anoxia sea el estímulo que causa la liberación de los factores angiogénicos; una alta densidad de vascularización está relacionada con un número reducido de regiones necróticas y posiblemente con una tendencia a desarrollar metástasis. Tanto la invasión como la metástasis son dos procesos muy complejos que involucran la actividad de varios genes; por ejemplo p53 induce la expresión de genes que codifican para proteínas antiangiogénicas potentes; las mutaciones frecuentes encontradas en p53 evidentemente favorecen la angiogénesis; mutaciones que activan al gen ras inducen la expresión del VEGF. Con respecto a metástasis, existen genes tales como nm23-H1 cuyo producto controla negativamente este proceso durante la carcinogénesis en etapas múltiples. Para el diseño de mejores métodos de diagnóstico y de terapias dirigidas, es necesario entender las alteraciones genéticas y epigenéticas que ocurren en etapas múltiples durante el desarrollo de una neoplasia (47-52).

HPV y cáncer genital

Además de los oncogenes y antioncogenes celulares mencionados anteriormente, en el caso del cáncer cérvico uterino (CaCu) participan los HR-HPV. Entre las evidencias que indican que algunos HR-HPV están involucrados causalmente en CaCu, tenemos: 1) El DNA viral se encuentra en más del 90% de dichos tumores; 2) El DNA de HPV se integra al genoma celular, inactivándose el gen E2 y favoreciendo la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (Fig. 9); 3) Se ha detectado

mRNA y proteína de los oncogenes E6 y E7 en tumores y líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales; 4) Se ha demostrado que la expresión de E6 y E7, provenientes de los HPV16 o 18, es capaz de inmortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos. Además, al cultivar durante periodos prolongados las células inmortalizadas por E6 y E7, estas dan origen a clonas malignas, lo que sugiere que un gen celular se modifica en dichos cultivos; 5) Las oncoproteínas virales E6 y E7 destruyen la actividad de las proteínas antioncogénicas p53 y pRb, respectivamente (53, 54).

Con base en su asociación con cáncer genital, los HPV se pueden clasificar en grupos de bajo riesgo (tipo 6, 11), riesgo intermedio (tipo 31, 33, 35) o alto riesgo (tipo 16, 18). En cuanto a la integración del genoma viral al DNA celular, cuando la lesión progresa de precancerosa a cancerosa, vale la pena destacar: (1) La integración en el genoma celular es al azar, aunque en algunos casos nuestro grupo ha encontrado que ocurre dentro o muy cerca del gen *c-myc*, sugiriendo que tanto HPV como oncogenes celulares activados (*c-myc*) participan en la progresión del CaCu; (2) El DNA viral se rompe en la región E1-E2 (Fig. 9), lo que conlleva a la inhibición de síntesis de la proteína E2; esta proteína actúa como inhibidor de la transcripción de los oncogenes virales de los HR-HPV genitales, pero activa aquella de los HPV cutáneos. Es decir, la integración del genoma viral con la consecuente inhibición de la expresión del transregulador negativo E2, estimula la expresión de los oncogenes de HPV genitales (Fig. 9); esto inactiva a las proteínas p53 y pRb, favoreciendo el avance del ciclo celular y el desarrollo del carcinoma genital. Respecto a los mecanismos que llevan a una inhibición de la apoptosis por estos virus, se ha reportado recientemente que células infectadas por HPV16 son resistentes a la apoptosis mediada por la vía de Fas (CD95) (55). Las células que contienen HPV16 pueden inducir apoptosis si se bloquea la degradación de p53 inducida por la oncoproteína E6 (56). De gran interés ha sido observar que la capacidad de la oncoproteína viral E7 para asociarse con pRb es crítica para generar y/o mantener un ambiente celular que lleve a la replicación del genoma viral, ya que las mutaciones en el dominio LXCXE de E7 impiden el ciclo de vida de los HR-HPV. Estas mutantes son además deficientes en transformación empleando diferentes sistemas. Además de la unión y degradación de pRb, E7 tiene otros blancos celulares que son relevantes para la transformación celular. HR-HPV E7 puede anular la actividad bloqueadora del crecimiento celular que caracteriza a los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas, tales como p21^{CIP1} y p27^{KIP1}. La inducción de síntesis de DNA celular o viral aberrante en queratinocitos en diferenciación lleva a señales de crecimiento opuestas que desencadenan mecanismos celulares de defensa para eliminar dichas células en proliferación por apoptosis o senescencia o bien favorecen diferenciación. En ratones transgénicos la expresión de E7 causa proliferación aberrante y muerte celular. Las proteínas E6 de los HR-HPV eliminan esta respuesta a E7 por inactivación de p53. Las oncoproteínas E6 de los HR-HPV pueden interaccionar con factores celulares importantes en la actividad transcripcional de p53, como p300 y pueden inducir la expresión de hTERT a nivel transcripcional. Estas proteínas E6 de los HR-HPV también presentan propiedades transformantes independientes de p53, al contener una región que puede unirse al dominio PDZ de algunas proteínas, lo cual es relevante en transformación celular. Así, en ratones transgénicos, la habilidad de la proteína E6 de HR-HPV para inducir hiperplasia en piel es dependiente de la integridad de la región de unión al dominio PDZ (57).

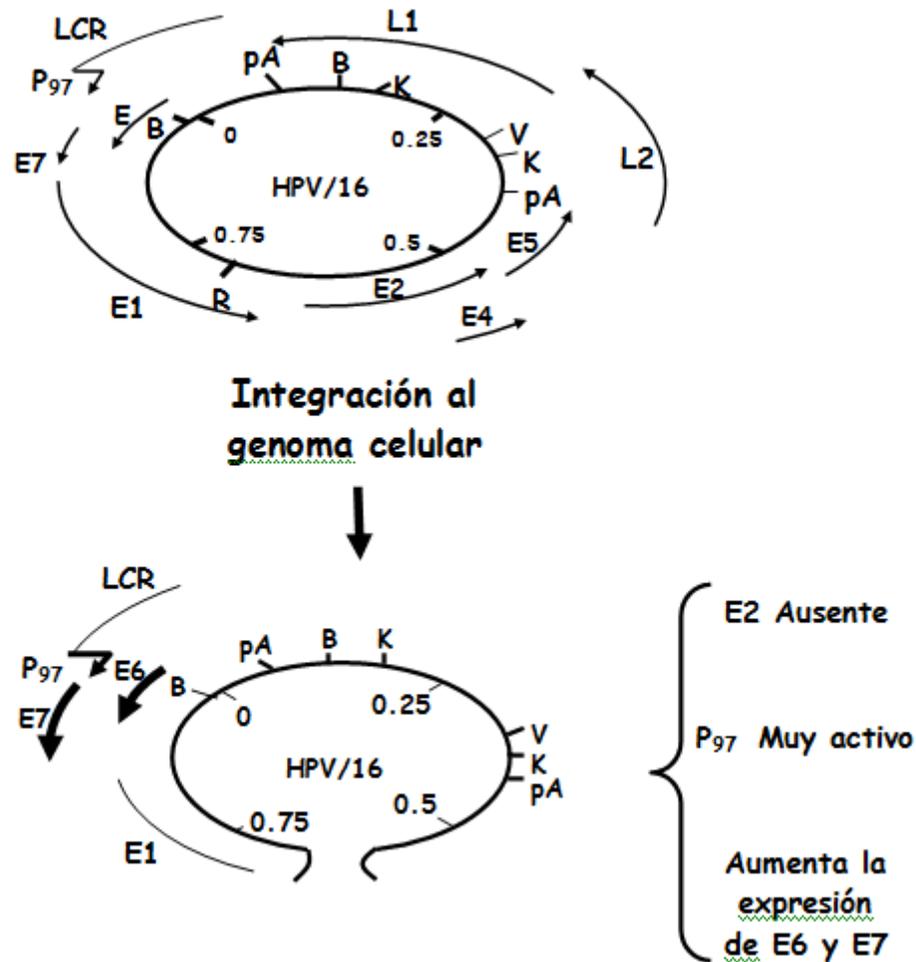


Figura. 9. Mapa genético del papilomavirus humano tipo 16 (HPV16). El genoma del papilomavirus (de 8Kb aprox.) es de doble cadena, contiene toda la información genética en una cadena, y está dividido en genes tempranos (E), tardíos (L) y una región larga de control (LCR). pA, señal de poliadenilación. B, Bam H1; R, Eco R1; K, Kpn 1; V, Eco RV, son sitios de restricción de HPV16. P97 es el promotor temprano. Se indica la interrupción del genoma viral al integrarse al genoma celular, con el consiguiente bloqueo en la síntesis de la proteína E2 (Transregulador negativo de la transcripción de los oncogenes E6 y E7 de los HPV genitales). En ausencia de E2, el promotor p97 es muy activo y se incrementa la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, con lo cual se favorecerá la inhibición de p53 y de pRb, respectivamente.

Claramente, en células que expresan E6/E7 son necesarios eventos oncogénicos adicionales para una transformación celular completa *in vitro* o *in vivo*. Consistente con esta idea podemos mencionar que los carcinomas cervicales contienen anomalías cromosómicas frecuentes, tales como la ganancia del cromosoma 3q, lo cual ocurre en la transición entre displasia severa y cáncer invasor. La presencia de figuras mitóticas tripolares es característica en lesiones positivas para HR-HPV; estas figuras son causadas por anomalías de los centrosomas, las cuales han sido detectadas también en lesiones cervicales y de piel en ratones transgénicos que expresan E6 y/o E7 de HPV16. Al parecer la oncoproteína viral E7 contribuye fuertemente a la inducción de inestabilidad genómica al favorecer errores en la duplicación de los centrosomas (53, 54).

En conclusión, los HR-HPV claramente ejercen algunos de sus efectos proliferativos mediante la cooperación de sus oncogenes (*E6*, *E7*) con la de oncogenes celulares (*myc*, *ras*), así como mediante la inhibición de la función de proteínas supresoras de tumor. El diagnóstico de las alteraciones genéticas y de los perfiles de expresión de oncogenes y genes supresores de tumor y de HR-HPV en lesiones genitales, es muy importante en clínica ya que permitirá el diseño de nuevos métodos de prevención y terapia del cáncer cervicouterino.

Agradecimientos

Quisiera agradecer la valiosa colaboración de Elizabeth Alvarez Rios, Enrique García Villa, Rodolfo Ocadiz Delgado y Gabriela Mora (CINVESTAV-IPN) durante la elaboración de este trabajo.

Referencias

1. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) Cell. 100(1):57-70.
2. zur Hausen, H. (1999) Semin Cancer Biol. (6):405-11.
3. Hunter, T., Pines, J. (1994). Cell 79: 573-582.
4. Juin, P., Hueber, A.O., et al. (1999). Genes Dev. 13:1367-1381.
5. Shachaf, C.M. and Felsher, D.W. (2005) Cancer Res. 1;65(11):4471-4.
6. Dang, C.V., O'donnell, K.A. and Juopperi, T. (2005) Cancer Cell. 8(3):177-8.
7. Ponzielli, R., Katz, S., Baryte-Lovejoy, D. and Penn, L.Z. (2005) Eur J Cancer. 41(16):2485-2501.
8. Adhikary, S. and Eilers, M. (2005) Nat Rev Mol Cell Biol. 6(8):635-645.
9. Frame, S. and Balmain, A. (2000). Current Opinion in Genetics and Develop. 10: 106-113.
10. Mamas, I.N., Zafiroopoulos, A., Sifakis, S., Sourvinos, G. and Spandidos, D.A. (2005) Int J Biol Markers. 20(4):257-63.
11. Blum, R. and Kloog, Y. (2005) Drug Resist Updat. 6:369-380.
12. Friday, B.B. and Adjei, A.A. (2005) Biochim Biophys Acta. 1756(2):127-144.
13. Bianco, R., Melisi, D., Ciardiello, F. and Tortora, G. (2006) Eur J Cancer. 42(3):290-294.
14. Cortazzo, M. and Schor, N.F. (1996). Cancer Res. 56,1199-1203.
15. Tan, C., Dlugosz, P.J., et al. (2006) J Biol Chem. 281(26):17689-98.
16. Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. and Adjei, A.A. (2005) Cancer J Clin. 55(3):178-94.
17. Cory, S. and Adams, J.M. (2005) Cancer Cell. 2005 8(1):5-6.
18. Shore, ER. (2005) J Appl Anim Welf Sci. 8(3):187-98.
19. Thomadaki, H., Talieri, M. and Scorilas, A. (2006) Biol Chem. (8):1081-6.
20. DeGregori, J., et al. (1997). PNAS USA 94: 7245-7250.
21. Galaktionov, K., Chen, X. and Beach, D. (1996) 382(6591):511-7.
22. Xu, H.J., et al. (1996). Cancer Res. 56, 2245-2249.
23. Korenjak, M. and Brehm, A. (2005) Curr Opin Genet Dev. 15(5):520-7.
24. Nguyen, D.X. and McCance, D.J. (2005) J. Cell Biochem. 94(5):870-9.
25. Zhu, L. (2005) Eur J Cancer. 41(16):2415-27.
26. Mitnacht, S. (2005) Eur J Cell Biol. 84(2-3):97-107.
27. Horner, S.M., DeFilippis, R.A., Manuelidis, L. and DiMaio, D. (2004) Virol. 78(8):4063-73.
28. Cox, L.S. and Lane, D.P. (1995). Bioessays. 17: 501-508.
29. Efeyan, A., et al. (2006) Nature. 443:159.
30. Christophorou, M.A., Ringshausen, I., et al. (2006) Nature Letters. 443:214.
31. Luqmani, Y.A. (2005) Med Princ Pract. 14 Suppl 1:35-48.
32. Lo, H.W., Day, C.P. and Hung, M.C. (2005) Adv Genet. 54:235-2355.
33. Steele, R.J. and Lane, D.P. (2005) Surgeon. 3(3):197-205.
34. Liu, S. and Seidel-Dugan, C. (2006) Curr Opin Drug Discov Devel. 9(2):176-183.
35. Royds, J.A. and Lacopetta, B. (2006) Cell Death Differ. Vol. 6:1017-26.
36. Martin, C.M., Astbury, K. and O'Leary, J.J. (2006) Expert Rev Mol Diagn. 6(2):217-229.
37. Massagué, J., Blain, S.W. and Lo, R.S. (2000). Cell. 103: 295-309.
38. Attisano, L. and Wrana, J. L. (2000). Curr. Opi. Cell Biol. 12:235-243.
39. Chen, C.R., Kang, Y. and Massagué, J. (2001). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:992-999.
40. Adnane J, Bizouarn FA, et al. (2000). Oncogene. 19:5525-5533.
41. Li H., et al. (2006) Cell Res. 16(2):169-73.
42. Vogelstein, B. and Kinsler, KW. (1993). Trends in Genetics 9,138-141.
43. Campisi, J. (2005) Cell. 120(4):513-22.
44. Chen, Z., et al. (2005) Nature. 436:725-730.

45. Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., et al. (1998). *Cell*. 92:713-723.
46. Hahn, W., et al. (1999). *Nature* 400: 468-472.
47. Toloza, E.M., et al. (2006) *J Cell Biochem*. 99(1):1-22.
48. Spurgers, K.B., et al (2006) *J Biol Chem*. 281(35):25134-42.
49. Hamilton, J.P. and Meltzer, S.J. (2006) *Clin Gastroenterol Hepatol*. 4(4):416-25.
50. Ando, T., et al. (2006) *Dis Esophagus*. 19(6):454-8.
51. Kanojia, D. and Vaidya, M.M. (2006) *Oral Oncol*. 42(7):655-67.
52. Dacic, S. (2007) *Expert Rev Mol Diagn*. (1):77-86.
53. Mûnger, K., et al. (2004) *Journal of Virology*. 78:11451-60.
54. Doorbar, J. (2006) *Clinical Science* 110:525-541.
55. Aguilar-Lemarroy, A., Kirchhoff, S., et al. (2001) *Int J Cancer*. 93(6):823-31.
56. Aguilar-Lemarroy, A., Gariglio P., et al. (2002) *Oncogene*. 21(2):165-75.
57. Nguyen, M.L, Nguyen, M.M, Lee D, Gripe, A.E. and Lambert, P.F. (2003) *J Virol*. 77(12):6957-64.

Semblanza del Dr. Patricio Gariglio Vidal



El Dr. Patricio Gariglio Vidal es Bioquímico por la Universidad de Chile (1967), Doctor of Philosophy in Molecular Biology, University of California (1968-1973), fué Posdoctoral Investigador Asociado en la University of California, San Diego, California (1974), Investigador Asociado en la Facultad de Ciencias (Laboratorio de Genética) de la Universidad Libre de Bruselas (1974-1978), Investigador Asociado en el "Instituto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Louis Pasteur" Estrasburgo, Francia (Laboratorio del Profesor Pierre Chambon) (1976-1980), Investigador Asociado en el "Instituto Pasteur Lille" Francia (1984). Realizó un año Sabático en el Departamento de Patología, Escuela de Medicina de Harvard, Boston Massachusetts. USA (1987-1988), ha sido Profesor Titular del

Departamento de Genética Biología Molecular en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D.F. (1980 a la fecha), Jefe del Departamento de Genética Microbiana del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas en el Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mor. (1991). Es Investigador Nacional Nivel III por el Sistema Nacional de Investigadores (1991), ha sido Director de Virología Molecular en el Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mor. (1993), ha sido Coordinador General del Programa Multidisciplinario de Biomedicina Molecular en el CINVESTAV-IPN (1994-1995), Co-fundador del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN (1996), Co-creador y Director General del Programa Interinstitucional de Biomedicina Molecular del CICATA-IPN (1996-1998), Coordinador de proyectos y Miembro del Consejo Técnico del CICATA-IPN (1998-1999) y obtuvo la beca anual única (TCRF) otorgada por la Union Internationale Contre le Cancer (UICC) para realizar Estancia Sabática en Estrasburgo, Francia (1999), entre otros.