



**Memoria del XLII Taller de Actualización Bioquímica**



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina



**Mensaje Bioquímico XXXIX**

# **MENSAJE BIOQUÍMICO**

**XXXIX**

Editores: A. Butanda, M. González, A. Guevara, R. Lara, D. Matuz,  
E. Molina y P. Torres

Vol. XXXIX, 2015

ISSN 0188-137X

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

### REQUISITOS

-Los manuscritos propuestos deben de cumplir con las siguientes características:  
-Ser manuscritos originales e inéditos, no remitidos a otra revista.  
-Todo material aceptado para su publicación quedará como propiedad del Mensaje Bioquímico.  
-Los manuscritos deberán ser enviados a la dirección de correo electrónico señalada por el Comité Editorial en la carta invitación.

### FORMATO

1. Formato del Manuscrito  
-El trabajo deberá constar de mínimo 15 cuartillas y un máximo de 25 (incluyendo carátula, resúmenes, manuscrito, tablas, cuadros, figuras, referencias y semblanza con foto).

### 2. Carátula

-Título en español e inglés máximo 15 palabras, no incluir abreviaturas o siglas.  
-Nombre completo de los autores, comenzando por quien presenta el trabajo (apellido paterno, materno y nombre).  
-Institución de procedencia.  
-Dirección electrónica y teléfono.

### 3. Resúmenes

-En español e inglés (No utilizar abreviaturas ni citar referencias).  
-Extensión máxima media cuartilla, cada uno.  
-Palabras clave en español e inglés (máximo 5).

### 4. Texto

-En arial a 12 puntos, con espacio de 1.5, a renglón seguido, en un procesador de textos computarizado (WORD) empleando los criterios estándar del mismo procesador, como es margen y tamaño de hoja carta.  
-Los nombres genéricos, posología y vías de administración de fármacos, drogas o sustancias químicas, indicados y expresados conforme la nomenclatura internacional.

### 5. Ilustraciones

-Máximo 10 (tablas, cuadros, figuras, fotografías).  
- Figuras identificadas con números arábigos progresivos de acuerdo al orden de aparición en el texto, deben tener títulos y una explicación breve.  
- Tablas identificadas con números romanos, progresivos, de acuerdo al orden de aparición, encabezadas por un título y cuya información no se repita en el texto.  
-Las figuras deben ser enviadas en formato TIFF con una resolución entre 200 y 300 dpi (ppp).  
-Todas las figuras y tablas que no sean de su autoría deben de ir referenciadas o con el permiso correspondiente.

### 6. Referencias

-Máximo 100, numeradas en orden progresivo.  
- Las citas de las referencias dentro del texto deberán aparecer entre paréntesis cuadrados.  
- Para las referencias de artículos se utilizará el formato establecido por The Journal of Biological Chemistry, se anexan ejemplos:

1. MacDonald, G. M., Steenhuis, J. J. y Barry, B. A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 8420-8428.

-Para libros.

1. López, CC. *El razonamiento médico.* Madrid, España: Ed. Díaz de Santos; 1994.  
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

-Capítulos de libro.

1. Anspaugh S. *Educating library users in two-years higher education institution.* En: John Lubans Jr, editor. *Educating the library user.* New York, USA: RR Bowker Company; 1974. P. 69-82.

### 7. Semblanza con foto

Deberá ser de media cuartilla con las mismas características de formato del manuscrito. La fotografía en formato TIFF con 200-300 dpi.

Notas adicionales:

No utilizar pies de página.  
No numerar las páginas.  
Por tratarse de un evento académico, desarrollado con el único fin de difundir los avances de las ciencias bioquímicas, es de hacer notar que ni los conferencistas ni el comité editorial reciben remuneración alguna por su trabajo.

Es importante aclarar que aquellos trabajos que no cumplan con los requisitos solicitados, así como con el tiempo de entrega, no serán publicados en el “Mensaje Bioquímico”.

## NSTRUCTIONS FOR AUTHORS

### REQUIREMENTS

Proposed manuscripts must fulfill with the following characteristics:  
-Must be unpublished and original manuscripts, not considered for publication in other journals.  
-All accepted material for publication will be owned of the Biochemical Message  
-Manuscript must be send to the e-mail adress indicated by the Editorial Board in the invitation letter

### FORMAT

1. Manuscript format  
-Manuscript must have an extension between 15-25 pages (including title page, abstract, manuscript, tables, figures, references and biographical sketch with picture).

### 2. Title page

-Title in spanish and english with a maximun of 15 words. Not include abbreviations or acronym.  
-Complete name of authors, beginning with the presenter author (last name and given name).  
-Institution  
-E-mail adress and phone number

### 3. Abstrac

-Must be in spanish and english  
-Maximun extention of half of one page  
-Keywords in spanish and english

### 4. Text

-12-points Arial with 1.5 spaces per line, in a computerized text processor (WORD) using standard criteria of the same processor such as margin and letter size sheet.  
-Generic names, dosage and administration routes of drugs or chemicals substances must be indicated and expressed according to the international nomenclature.

### 5. Pictures

-Maximun 10 (including tables, figures and pictures).  
-Figures must be identified with progressive arabic numerals according to its appearance in the text and must contain a caption and a brief explanation.  
-Tables must be identified with progressive roman numerals according to its appearance in the text and must contain a caption whose information should not be repeated in the text.  
-Figures must be send in TIFF format with a resolution between 200 to 300 dpi.  
-All figures and tables that have been taken from another source must be adequately referenced and with author’s permission.

### 6. References

-Maximum 100, numbered in progressive order  
-Cites inside the text must appear in square brackets.  
-Cites format must be according to The Journal of Biological Chemistry, as follows:

1. MacDonald, G. M., Steenhuis, J. J. y Barry, B. A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 8420-8428.

-For books.

1. López, CC. *El razonamiento médico.* Madrid, España: Ed. Díaz de Santos; 1994.  
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

-Book chapters

1. Anspaugh S. *Educating library users in two-years higher education institution.* En: John Lubans Jr, editor. *Educating the library user.* New York, USA: RR Bowker Company; 1974. P. 69-82.

### 7. Biographical sketch with picture

-Must be of half of a page with the same characteristics of the manuscript. Picture in TIFF format with a resolution between 200-300 dpi.

Additional notes:

Not use footpages

Not use page numbering

For being an academic event developed with the sole purpose of transmit the advances of the Biochemical Sciences, should be noted that neither the speakers nor the editorial board receive any remuneration for their work

It is important to clarify that those manuscripts that do not meet the requirements requested and delivery time, will not be published in the “Biochemical Message”.

**MENSAJE BIOQUÍMICO** es una revista académica arbitrada de publicación anual, editada por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Interior de Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510. Indizada en LATINDEX y PERIÓDICA. Ni la Facultad de Medicina ni la UNAM son responsables por las opiniones vertidas por los autores. Se prohíbe la reproducción parcial o total del contenido sin autorización previa. Editor Responsable: ALBERTO GUEVARA FLORES. 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 ULTRADIGITAL PRESS S.A. DE C.V. Centeno No. 195. Valle Del Sur 09819. Iztapalapa. México, D.F. México. Imagen superior. Fluorescencia de células INS1 (clona 3T7), que expresan establemente la proteína GGA1 truncada fusionada con GFP (señal verde). Núcleos teñidos con DAPI (azul). Imagen inferior: Inmunofluorescencia indirecta, células INS1 que expresan establemente la proteína Vps35 (rojo). Insulina en azul y pro-catepsina D en verde. Fotografías tomadas en el microscopio confocal Olympus FV500, del Morphology and Image Analysis Core, of The Michigan Diabetes Training Center, University of Michigan, por Roberto Lara Lemus, durante su estancia posdoctoral en el 2007 y 2008. Diseño: JOSÉ DE JESUS MARTÍNEZ GONZÁLEZ y JUAN ANTONIO ROCHA SANTIAGO.

# **MENSAJE BIOQUÍMICO**

## **EDITORES:**

**ARMANDO BUTANDA OCHOA  
MARTÍN GONZÁLEZ ANDRADE  
ALBERTO GUEVARA FLORES  
ROBERTO DE JESÚS LARA LEMUS  
DEYAMIRA MATUZ MARES  
EDUARDO MOLINA JIJÓN  
PATRICIA VICTORIA TORRES DURÁN**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**VOL. XLII**

**2015**

**5 de junio de 2015 a 4 de junio de 2016**

---

## ÍNDICE

<b>EDITORIAL</b>	<b>VI</b>
<b>PROGRAMA</b>	<b>XIII</b>
<b>Dr. Jorge Peón Peralta</b> “Espectroscopía y microscopía con pulsos de radiación láser”	<b>1</b>
<b>Dr. Mario A. Rodríguez Rivera</b> “Nanomateriales orgánicos fluorescentes para microscopía confocal y de dos fotones”	<b>5</b>
<b>Dr. Rubén G. Contreras Patiño</b> “Control de la adhesión celular epitelial: aportes de la microscopía confocal”	<b>19</b>
<b>Dr. Agustín López Munguía</b> “Las enzimas más allá del inicio de la reacción”	<b>41</b>
<b>Dra. María del Carmen Jiménez Martínez</b> “Avances terapéuticos en el área de inmunología ocular”	<b>59</b>
<b>Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl</b> “Patogénesis molecular del cáncer cérvico uterino asociado a papilomavirus humano”	<b>81</b>
<b>Dr. Víctor Valdés López</b> “Apuntes sobre genómica V 2.0”	<b>101</b>
<b>Dra. Rosa E. Navarro González</b> “Respuestas de las células germinales del nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i> al estrés”	<b>123</b>
<b>Dra. Ma. Luisa Villarreal Ortega</b> “Explorando la biotecnología vegetal para producir medicamentos de plantas mexicanas”	<b>145</b>

---

<b>M.C. Aldo Ferreira Hermosillo</b>	<b>165</b>
"Resistencia a la insulina en pacientes con diabetes mellitus tipo 1"	
<b>Dr. Iván Velasco Velázquez</b>	<b>187</b>
"Diferenciación neuronal de células troncales"	
<b>Dra. Ma. Soledad Funes Argüello</b>	<b>205</b>
"La célula pone y la mitocondria dispone: estrés, longevidad y muerte celular"	
<b>Dra. Nuria V. Sánchez Puig</b>	<b>223</b>
"Biogénesis ribosomal y ribosomapatías"	
<b>Dr. Antonio E. Lazcano Araujo Reyes</b>	<b>245</b>
"Revisando la cuestión del origen y la evolución de los virus"	

**XLII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA**  
**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina, UNAM**

Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 3 al 5 de junio de 2015

**Actividades antes de la hora de la comida**

<b>Horario</b>	<b>Miércoles</b>	<b>Jueves</b>	<b>Viernes</b>
8:00-9:00	<b>INAUGURACIÓN</b>	<b>M.C. Gerardo Hernández P.</b> Hospitalito Gustavo Guerrero A.C. <i>"La biología molecular del cáncer y su aplicación clínica"</i> <b>NO EDITADO</b>	<b>M.C. Aldo Ferreira H.</b> Endocrinología Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI <i>"Resistencia a la insulina en pacientes con diabetes mellitus tipo 1"</i>
9:00-10:00	<b>Dr. Jorge Peón P.</b> Instituto de Química. UNAM. <i>"Espectroscopía y microscopía con pulsos de radiación láser"</i>	<b>Dra. María del Carmen Jiménez M.</b> Departamento de Úvea. Instituto de Oftalmología, Fundación Conde de Valenciana, México, DF. <i>"Avances terapéuticos en el área de inmunología ocular"</i>	<b>Sesión técnica</b>  <b>NO EDITADO</b>
10:00-10:20	Receso	Receso	Receso
10:20-11:20	<b>Dr. Federico A. García J.</b> Departamento Productos Naturales. Instituto de Química. UNAM. <i>"Movimientos orientados de los cloroplastos"</i> <b>NO EDITADO</b>	<b>Dra. María de Lourdes Gutiérrez X.</b> Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Pública. <i>"Patogénesis molecular del cáncer cérvico uterino asociado a papilomavirus humano"</i>	<b>Dr. Iván Velasco V.</b> Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología. IFC. UNAM <i>"Diferenciación neuronal de células troncales"</i>
11:20-12:20	<b>Dr. Mario A. Rodríguez R.</b> Centro de Investigaciones en Óptica A.C. <i>"Nanomateriales orgánicos fluorescentes para microscopía confocal y de dos fotones"</i>	<b>Dr. Víctor Valdés L.</b> Facultad de Ciencias. UNAM. <i>"Apuntes sobre genómica V 2.0"</i>	<b>Dra. Ma. Soledad Funes A.</b> Departamento de Genética Molecular. IFC. UNAM. <i>"La célula pone y la mitocondria dispone: estrés, longevidad y muerte celular"</i>
12:20-12:40	Receso	Receso	Receso
12:40- 13:40	<b>Dr. Rubén G. Contreras P.</b> Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. Cinvestav. <i>"Control de la adhesión celular epitelial: aportes de la microscopía confocal"</i>	<b>Dra. Rosa E. Navarro G.</b> Departamento de Biología Celular y Desarrollo. IFC. UNAM. <i>"Respuestas de las células germinales del nemátodo Caenorhabditis elegans al estrés"</i>	<b>Dra. Nuria V. Sánchez Puig</b> Departamento de Biomacromoléculas. IQ. UNAM <i>"Biogénesis ribosomal y ribosomopatías"</i>

13:40-14:40	<b>Dr. Agustín López M.</b> Instituto de Biotecnología. UNAM. <i>“Las enzimas más allá del inicio de la reacción”</i>	<b>Dra. Ma. Luisa Villarreal O.</b> Centro de Investigación en Biotecnología. UAEM. <i>“Explorando la biotecnología vegetal para la producción de fármacos”</i>	<b>Dr. Antonio E. Lazcano Araujo R.</b> Facultad de Ciencias. UNAM. <i>“Revisando la cuestión del origen y la evolución de los virus”</i>
14:40-17:00	Comida	Comida	Comida

**XLII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA**  
**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina, UNAM**

Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 3 al 5 de junio de 2015

**Actividades después de la hora de la comida**

<b>Horario</b>	<b>Miércoles</b>	<b>Jueves</b>	<b>Viernes</b>
17:00-19:00	<b>Introducción a Moodle</b>	<b>Introducción a Moodle</b>	<b>Introducción a Moodle</b>



Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, VI-XI, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>) (ISSN-0188-137X)

## Editorial

En diciembre de 2013, la Asamblea General de la ONU declaró el año 2015 como *El Año Internacional de la Luz y las Tecnologías Basadas en la Luz*”, reconociendo con ello la importancia de este fenómeno y de las posibilidades de las tecnologías basadas en la luz en la solución de problemas mundiales en energía, salud, agricultura y educación.

En 2015 se conmemoran los aniversarios de diversos descubrimientos relacionados con la luz: en 1015 se publicó el primer Libro de Óptica, de Ibn Al Haythem; en 1815, Fresnel estableció la naturaleza ondulatoria de la luz, después de los debates del siglo XVII entre físicos como Newton, Hooke y Descartes; en 1865, el establecimiento del electromagnetismo por Maxwell; el establecimiento de la teoría del efecto fotoeléctrico y la relatividad general desarrollados por Einstein entre 1905 y 1915, hasta llegar finalmente al desarrollo de la tecnología de las fibras ópticas por Charles Kao.

El Año Internacional de la Luz es un proyecto multidisciplinario educativo y de divulgación, en el que participan científicos mexicanos y el estudio de sus aplicaciones se convierte en una herramienta muy útil en el campo de la Biología Celular, de la Bioquímica y de la Medicina. Por este motivo, el Comité organizador del XLII Taller de Actualización Bioquímica lo ha propuesto como uno de los temas centrales del mismo.

---

Para introducirnos en el campo, el Dr. Jorge Peón Peralta, del Instituto de Química de la UNAM nos hablará sobre los fundamentos y el uso de pulsos de radiación láser, en el desarrollo de instrumentación y metodologías como la Espectroscopía ultrarrápida de fluorescencia y microscopía óptica, para el estudio de fenómenos moleculares con resolución en femtosegundos, lo que ha sido una de sus líneas de investigación desde hace años.

A continuación, el Dr. Federico A. García Jiménez, del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM, nos hablará de cómo la Microscopía de Resolución Atómica y molecular es una herramienta para estudiar los movimientos orientados de los cloroplastos y las implicaciones de estos movimientos en la Fotosíntesis.

Una de las tecnologías derivadas de la luz, con un gran potencial en Biología Celular para ver estructuras en células vivas con un alto grado de resolución fue el desarrollo del microscopio confocal, el cual emplea una diversidad de fluoróforos y de láseres muy potentes para alcanzar dicha resolución. El Dr. Mario A. Rodríguez Rivera, del Centro de Investigaciones en Óptica A.C. nos platicará de los métodos utilizados para obtener nanomateriales orgánicos fluorescentes fotoestables con actividades bifotónicas aceptables para ser utilizados como agentes de contraste para la microscopía confocal.

Muy ligado con el trabajo anterior, el Dr. Rubén G. Contreras Patiño, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, del CINVESTAV, nos lleva a realizar un recorrido sobre el uso de diversos tipos de microscopios como herramientas para dilucidar estructuras subcelulares y su fisiología, hasta llegar al uso del microscopio confocal como un instrumento para determinar las dos características principales de las células epiteliales, así como las moléculas y el mecanismo fisiológico implicados en el control de la adhesión de estas células.

Una de las aplicaciones tradicionales de la luz es el uso de aparatos espectrofotométricos para la determinación de las actividades enzimáticas. Desde principios del siglo pasado, varios investigadores han enfocado sus investigaciones a dilucidar los mecanismos cinéticos del comportamiento de las enzimas y han planteado diferentes modelos matemáticos para describirlos. Tradicionalmente se ha analizado sólo lo que ocurre en el inicio de la reacción enzimática, sin embargo, esto plantea limitaciones en la comprensión del comportamiento cinético real de las enzimas. El Dr. Agustín López Munguía, del

---

Instituto de Biotecnología de la UNAM nos habla de lo que ocurre al alejarse de la velocidad inicial y se toman en cuenta otras condiciones como la reversibilidad de la reacción enzimática, el efecto de los productos o la desactivación de la enzima.

Un campo en el que se han estudiado los efectos de diferentes tipos de luz es el correspondiente a la salud. La luz puede ser considerada como una forma de energía que forma parte del espectro electromagnético. Aunque cuando hablamos de luz, casi siempre nos referimos al rango de la luz visible -el cual sólo abarca longitudes de onda que van desde  $3.8 \times 10^{-5}$  a  $7.6 \times 10^{-5}$  cm-, se pueden estudiar los efectos de radiaciones de longitudes más cortas y mayor energía, o de longitudes de onda más largas y menor energía, sobre las células. Algunos ejemplos son el efecto de las radiaciones ultravioleta y las radiaciones ionizantes como causa de mutaciones en el ADN de los organismos y sus implicaciones en la aparición de enfermedades como el cáncer; o el uso de otras radiaciones, como los rayos X y los rayos gamma en ciertas tecnologías para el diagnóstico y tratamiento de varias patologías.

El cáncer se ha asociado a una acumulación de mutaciones en genes que codifican para proteínas reguladoras del ciclo celular, y a mecanismos deficientes de reparación del ADN. El MC Gerardo Hernández Puga, oncólogo médico del “Hospitalito Gustavo Guerrero, AC”, nos hablará de la biología molecular del cáncer y cómo este conocimiento se aplica en la clínica, tanto en el diagnóstico, pronóstico y terapéutica más adecuada a la patología presentada por los pacientes.

Otra área de la salud en la que puede estudiarse los efectos de la luz es en la forma en que la percibimos. De ahí que el estudio de las causas de las enfermedades oculares sea de gran importancia. La Dra. María del Carmen Jiménez Martínez, del Departamento de Úvea del Instituto de Oftalmología de la Fundación Conde de la Valenciana nos habla de la importancia de la caracterización inmunofisiopatológica de las enfermedades oculares y cuáles son los nuevos enfoques terapéuticos que se están explorando en el área de la inmunología ocular.

A continuación la Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl, del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, del Instituto Nacional de Salud Pública nos habla de los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis del cáncer cérvico uterino asociado a los tipos 16 y 18 del Virus del Papiloma Humano.

---

En un trabajo muy ameno, el Dr. Víctor Valdés López, de la Facultad de Ciencias de la UNAM nos plantea, en una línea del tiempo, cómo ha evolucionado el estudio del DNA, de los genes y la genómica, desde Lamarck hasta los aportes de la epigenética. Nos habla de un enfoque evolutivo de la relación entre el número de genes con la secuencia, estructura y función de las proteínas y las aportaciones de la epigenética en la regulación de la expresión genética en eucariontes, para terminar con una serie de preguntas en este último campo cuya respuesta permitirá una comprensión mayor del “multilinguaje” del genoma.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que resulta esencial para el desarrollo y la supervivencia de muchos organismos multicelulares, por lo que el estudio de su regulación es un campo de gran interés. Dada la simplicidad del proceso de apoptosis en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, este organismo se ha utilizado como modelo para estudiar los distintos tipos de apoptosis existentes y los diversos aspectos que pueden inducirlos. La Dra. Rosa E. Navarro González, del Departamento de Biología Celular y Desarrollo, del Instituto de Fisiología Celular (IFC) nos habla de la regulación de la apoptosis de las células germinales de *C. elegans* en diferentes condiciones de estrés: osmótico, oxidativo, térmico y por ayuno.

Como mencionábamos previamente, la luz se utilizó en la construcción de instrumentos de detección de moléculas de interés o en diversas áreas de investigación. La Dra. María Luisa Villarreal Ortega, del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM utiliza la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones (RMN  $^1\text{H}$ ), como una herramienta en la investigación metabólica de la planta mexicana *Galphimia glauca*, quien tiene propiedades ansiolíticas y sedantes. Además, nos platica cómo este tipo de estudios permiten estandarizar las condiciones de producción de fitomedicamentos y controlar su calidad.

Un problema de salud muy importante en México es el Síndrome metabólico, el cual, tradicionalmente se ha asociado a la Diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, en los últimos años se ha visto que, pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 no están exentos de desarrollar la resistencia a la insulina característica del Síndrome metabólico (diabetes doble). A pesar de su importancia hay pocos estudios realizados en el país El MC Aldo Ferreira Hermosillo del Área de Endocrinología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo

---

XXI, nos presenta los estudios relacionados con la resistencia a la insulina en pacientes mexicanos con diabetes tipo I y los posibles mecanismos de implantación de esta doble diabetes.

El descubrimiento de los RNA micro (miRNA) ha abierto nuevas posibilidades en la elucidación de procesos biológicos tan complejos como la proliferación celular. La Dra. María Eugenia Torres Márquez, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM nos hablará de sus estudios en el uso de los microRNA en las cascadas de transducción de señales en la proliferación celular, en diferentes modelos.

El Dr. Iván Velasco Velázquez, del Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología del IFC de la UNAM nos presenta su trabajo sobre la Diferenciación neuronal de células troncales y los factores que se encuentran implicados en este proceso.

Las células han desarrollado diferentes mecanismos de detección de cambios en el medio ambiente y transmiten esa información a través de cascadas de señalización, con el fin de responder a esos cambios, ya sea diferenciándose, envejeciendo o entrando en apoptosis. La mitocondria es un organelo que tradicionalmente se ha asociado al metabolismo oxidativo y en la generación de energía. Sin embargo, se han vinculado con otras funciones como el envejecimiento y eventualmente la muerte celular. La Dra. Ma. Soledad Funes Argüello, del Departamento de Genética Molecular del IFC nos presenta una pequeña revisión sobre cómo la detección de cambios en el medio ambiente por ciertas vías de señalización muy conservadas, como TOR y RAS, provocan que las mitocondrias regulen y determinen el destino celular.

Otros organelos que deben adaptarse a cambios en el entorno son los ribosomas, cuya producción depende de la disponibilidad de recursos. Las fallas en la producción o en la función de estos organelos conducen al desarrollo de enfermedades, llamadas genéricamente ribosomopatías. La Dra. Nuria V. Sánchez Puig, del Departamento de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM nos presenta la biogénesis ribosomal y las patologías asociadas a problemas de transcripción y ensamblaje de las subunidades ribosomales, las manifestaciones clínicas y el posible mecanismo implicado en cada una de dichas ribosomopatías.

---

El último trabajo del TAB es presentado por el Dr. Antonio E. Lazcano Araujo Reyes, de la Facultad de Ciencias de la UNAM, quien en esta ocasión nos platica sobre el origen y la evolución de los virus y los estudios que sostienen su propuesta.

Finalmente, la Comisión promotora del Año Internacional de la Luz expresó: *“...la luz está presente en todos lados, desde el origen de la vida, en la salud, en comunicaciones e Instrumentos ópticos, y en el estudio del Universo; sin la luz que nos llega de los objetos celestes no podríamos conocer su naturaleza. El AIL puede servir para remarcar nuestra herencia cultural, para mejorar la educación en todos los niveles, impulsar el conocimiento de la naturaleza y, desde luego, mostrar las tecnologías en el arte.”* En este contexto deseamos que los aportes de los investigadores de este XLII Taller de Actualización Bioquímica iluminen sus trabajos y su vida que haga de su participación en el Taller, una experiencia personal del AIL.

M. en C. María Alicia del Sagrado Corazón Cea Bonilla  
Junio 2015

---

## **Agradecimientos**

La realización de este evento ha sido posible gracias al apoyo que nos ofrece la Facultad de Medicina a través del Director, el Dr. Enrique Graue y la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, Secretaria General.

Por la difusión oportuna del Taller de Actualización Bioquímica 2015 agradecemos al Dr. Hugo E. Huitrón Vera, Director de la Gaceta, UNAM, a la Sra. Martha Marín Zapata, Jefa del Departamento de Información y Prensa de la Gaceta de la Facultad de Medicina y al Personal a su cargo. Además de todo el apoyo de la Imprenta de la Facultad de Medicina por la impresión de los posters y trípticos para la difusión de nuestro evento.

Por último, queremos agradecer a las empresas patrocinadoras, ya que sin su apoyo no podríamos realizar el Taller de Actualización Bioquímica: ASPELAB, McGraw-Hill, ELSEVIER, Lippincott, Panamericana y Biosys.

---

**XLII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA**  
**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina, UNAM**  
Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 3 al 5 de junio de 2015

**MIÉRCOLES**

8:00 -9:00

**Inauguración**

**Conferencias**

09:00 - 10:00

**Dr. Jorge Peón Peralta**

Instituto de Química. UNAM.

“Espectroscopía y microscopía con pulsos de radiación láser”

10:20 - 11:20

**Dr. Federico A. García Jiménez**

Departamento Productos Naturales. Instituto de Química. UNAM.

“Movimientos orientados de los cloroplastos”

11:20 -12:20

**Dr. Mario A. Rodríguez Rivera**

Centro de Investigaciones en Óptica A.C.

“Nanomateriales orgánicos fluorescentes para microscopía confocal y de dos fotones”

12:40 - 13:40

**Dr. Rubén G. Contreras Patiño**

Departamento de Fisiología, Biofísica y

Neurociencias. Cinvestav.

“Control de la adhesión celular epitelial: aportes de la microscopía confocal”

13:40 – 14:40

**Dr. Agustín López Munguía**

Instituto de Biotecnología. UNAM.

“Las enzimas más allá del inicio de la reacción”

17:00 - 19:00

**Introducción a Moodle**

---

**XLII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA**  
**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina, UNAM**  
Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 3 al 5 de junio de 2015

**JUEVES**

8:00 – 9:00

**M.C. Gerardo Hernández Puga**

Hospitalito Gustavo Guerrero A.C.

“La biología molecular del cáncer y su aplicación clínica”

9:00 – 10:00

**Dra. María del Carmen Jiménez Martínez**

Departamento de Úvea. Instituto de Oftalmología, Fundación Conde de Valenciana, México, DF.

“Avances terapéuticos en el área de inmunología ocular”

10:20 – 11:20

**Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl**

Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Pública.

“Patogénesis molecular del cáncer cérvico uterino asociado a papilomavirus humano”

11:20 – 12:20

**Dr. Víctor Valdés López**

Facultad de Ciencias. UNAM.

“Apuntes sobre genómica V 2.0”

12:40 – 13:40

**Dra. Rosa E. Navarro González**

Departamento de Biología Celular y Desarrollo. IFC. UNAM.

“Respuestas de las células germinales del nemátodo *Caenorhabditis elegans* al estrés”

13:40 -14:40

**Dra. Ma. Luisa Villarreal Ortega**

Centro de Investigación en Biotecnología. UAEM.

“Explorando la biotecnología vegetal para la producción de fármacos”

17:00 – 19:00

**Introducción a Moodle**

---

**XLII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA**  
**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina, UNAM**  
Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 3 al 5 de junio de 2015

**VIERNES**

8:00 – 9:00

**M.C. Aldo Ferreira Hermosillo**

Endocrinología Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI  
"Resistencia a la insulina en pacientes con diabetes mellitus tipo 1"

9:00 -10:00

**Sesión Técnica**

10:20 - 11:20

**Dr. Iván Velasco Velázquez**

Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología. IFC. UNAM  
"Diferenciación neuronal de células troncales"

11:20 - 12:20

**Dra. Ma. Soledad Funes Argüello**

Departamento de Genética Molecular. IFC. UNAM.  
"La célula pone y la mitocondria dispone: estrés, longevidad y muerte celular"

12:40 - 13:40

**Dra. Nuria V. Sánchez Puig**

Departamento de Biomacromoléculas. IQ. UNAM  
"Biogénesis ribosomal y ribosomopatías"

13:40 - 14:40

**Dr. Antonio E. Lazcano Araujo Reyes**

Facultad de Ciencias. UNAM.  
"Revisando la cuestión del origen y la evolución de los virus"

17:00 -19:00

**Introducción a Moodle**

---

**XLII TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA**  
**Departamento de Bioquímica**  
**Facultad de Medicina, UNAM**  
Auditorio Alberto Guevara Rojas, del 3 al 5 de junio de 2015

Comité organizador del XLII Taller de Actualización Bioquímica

<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>

Armando Butanda Ochoa  
Facultad de Medicina, UNAM  
[abutanda11@hotmail.com](mailto:abutanda11@hotmail.com)

Martín González Andrade  
Facultad de Medicina, UNAM  
[martin@bq.unam.mx](mailto:martin@bq.unam.mx)

Alberto Guevara Fonseca  
Facultad de Medicina, UNAM  
[quevarafa@yahoo.com.mx](mailto:quevarafa@yahoo.com.mx)

Roberto Lara Lemus  
Facultad de Medicina, UNAM  
[betony44@hotmail.com](mailto:betony44@hotmail.com)

Deyamira Matuz Mares  
Facultad de Medicina, UNAM  
[deyabq@comunidad.unam.mx](mailto:deyabq@comunidad.unam.mx)

Eduardo Molina Jijón  
Facultad de Medicina, UNAM  
[emolina@fisio.cinvestav.mx](mailto:emolina@fisio.cinvestav.mx)

Patricia Victoria Torres Durán  
Facultad de Medicina, UNAM  
[pavitodu@yahoo.com.mx](mailto:pavitodu@yahoo.com.mx)



Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 1-4, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## Diseño de Compuestos Bi-Cromóforicos y Fotofísica de sus Estados Electrónicos Superiores

Jorge Peón Peralta

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México  
Dirección: Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria. Delegación Coyoacán, C.P.  
04510, México, D.F.  
jpeon@unam.mx

### RESUMEN

Se presentarán los conceptos centrales en el diseño de compuestos bicromóforos en los que la combinación de las propiedades de dos secciones en la misma molécula, produce efectos con aplicaciones en microscopía de superresolución. Estos compuestos están formados por un cromóforo efector (en el que se inducen reacciones fotoquímicas) y una sección que funciona como una “antena” molecular con capacidades de absorción bifotónica en la zona del infrarrojo cercano. Estos compuestos son capaces de liberar una molécula fluorescente de la sección efectora donde dicha liberación es secundaria a la excitación no-lineal de la sección antena. Gracias a que la excitación del sistema es bifotónica, este esquema permite la localización del compuesto liberado (fluorescente) en un volumen del orden de femtolitros, con una precisión de menos de una micra. También se describirá la dinámica de los estados excitados de estas moléculas mediante técnicas espectroscópicas con resolución temporal del orden de los femtosegundos y los picosegundos<sup>1</sup>.

**Palabras clave:** bicromoforos, superresolución, bifotónica, femtolitros

## ABSTRACT

Will be presented the central concepts in the design of bi-chromophore compounds, in which the combination of two sections of the same molecule can be applied in super-resolution microscopy. These compounds are formed by an effector chromophore (where some photochemical reactions are induced) and a molecular antenna section that has bi-photonic absorption capabilities in the close IR. These compounds can release a fluorescent molecule from the effector section where such release is secondary in comparison to the non-linear excitation from the antenna section. Thanks to the bi-photonic excitation of the system the localization of the released compound (fluorescent) can be possible in volumes of femtoliters with a precision of micrometers. Also it will be described the dynamics of the excited states of such molecules through the spectroscopic techniques with temporal resolution of femto and picoseconds<sup>1</sup>.

**Keywords:** bi-chromophore, super-resolution, bi-photonic, femtoliters

## Referencia

1. Guarín-Durán C. A., Villabona-Monsalve J. P., López-Arteaga R. and Jorge Peón. *Journal of Physical Chemistry B*. **2013**, 117, 7352-7362.

## Semblanza de Dr. Jorge Peón Peralta



El Dr. Jorge Peón Peralta es químico egresado de la Facultad de Química de la UNAM y realizó sus estudios doctorales en Físicoquímica en The Ohio State University bajo la dirección del Dr. Bern Kohler. Posteriormente, realizó una estancia posdoctoral en el California Institute of Technology (CALTECH) en el grupo del Prof. Ahmed Zewail, premio Nobel de Química en 1999 por el desarrollo de la espectroscopia ultrarrápida.

Las principales líneas de investigación del Dr. Peón incluyen el desarrollo y empleo de secuencias de pulsos láser para el estudio de procesos moleculares. Entre sus aportaciones más relevantes se encuentran los primeros estudios con resolución de femtosegundos de fenómenos de transferencia de carga, así como de la fotoquímica intrínseca del ADN y del rol de las intersecciones cónicas en las reacciones foto-inducidas. En años recientes, el Dr. Peón ha realizado investigaciones fundamentales sobre los procesos involucrados en la foto-degradación de compuestos poliaromáticos nitrados y en el diseño de cromóforos funcionales.

El Dr. Peón ha publicado 43 artículos de investigación, sus publicaciones científicas han sido citadas en más de 2000 ocasiones. Además es Investigador Titular C en el Departamento de Físicoquímica del Instituto de Química y es el actual director de ese instituto.





Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 5-18, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## **NANOMATERIALES ORGÁNICOS FLUORESCENTES PARA MICROSCOPIA CONFOCAL Y DE DOS FOTONES**

### **ORGANIC FLUORESCENT NANOMATERIALS FOR CONFOCAL AND TWO-PHOTON MICROSCOPY**

Rodríguez Rivera Mario A<sup>1</sup>, Aparicio-Ixta Laura<sup>1</sup> y Ramos-Ortíz Gabriel<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Óptica A.C.  
Loma del Bosque 115, Col. Lomas de Campestre 37150 León-Guanajuato. México  
mrodri@cio.mx 477 441 42 00

#### **RESUMEN**

En los últimos años, la popularidad de las nanopartículas fluorescentes se ha incrementado debido a sus importantes aplicaciones en biomedicina. Especialmente, las nanopartículas orgánicas fluorescentes son muy atractivas, debido a sus propiedades ópticas las cuales son utilizadas para desarrollar marcadores biológicos y agentes de contraste para microscopía confocal o multifotón. Para la fabricación de este tipo de materiales es necesaria la participación de científicos de distintas áreas como la química, la óptica, la ciencia de materiales, las ciencias biomédicas y la nanotecnología. Estos materiales se basan en moléculas orgánicas que contienen grupos fluoróforos dentro de arquitecturas electrónicas cuadrupolares, las cuales favorecen las propiedades ópticas no lineales. En particular, la fluorescencia inducida por la absorción de dos fotones (2FA) en la región del infrarrojo se usa como una poderosa técnica para el

estudio no invasivo de células y tejidos. El Grupo de Propiedades Ópticas de la Materia desarrolla nuevos materiales orgánicos fluorescentes los cuales son procesados en diferentes tipos de nanoestructuras incrementando su compatibilidad con el agua para ser usados en microscopía multifotón.

**Palabras clave:** nanomateriales, fluorescencia, microscopía de dos fotones

### **ABSTRACT**

Recently, research on fluorescent nanoparticles has increased due to their important applications in biomedicine. Especially, organic nanoparticles are very attractive, because they show interesting optical properties that are used to develop biological markers and contrast agents in confocal or multiphoton microscopy. To design and fabricate these materials, scientists from different fields such as chemistry, optics, materials science, biomedical sciences and nanotechnology are needed. These materials are based on organic molecules containing fluorophores in quadrupole electronic architectures, in which are increased their non-linear optical properties. In particular, fluorescence promoted by the Two-Photon Absorption (TPA) in the infrared region originates a powerful technique that allows a noninvasive imaging of cells and tissues. The Group of Optical Properties of Materials develops new organic fluorescent materials, which are processed to fabricate different nanostructures increasing their water compatibility to be used in two-photon fluorescence microscopy.

**Keywords:** nanomaterials, fluorescence, two-photon microscopy

### **INTRODUCCIÓN**

Los materiales orgánicos han mostrado tener una gran área de oportunidad para su uso en la fabricación de dispositivos fotónicos y optoelectrónicos, tales como diodos emisores de luz (OLEDs), transistores de efecto de campo (OFTs) o dispositivos fotovoltaicos (OPVs). Algunos de estos se encuentran disponibles para ciertas aplicaciones comerciales, otros más todavía se encuentran en desarrollo. En particular, dentro de la biomedicina los materiales orgánicos fluorescentes han encontrado aplicación para el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades. En este caso nos referimos a moléculas orgánicas que poseen eficiencias cuánticas altas y propiedades ópticas no lineales de tercer orden, en particular el fenómeno de absorción de dos fotones (2FA). Dichas propiedades generan la habilidad en el material de absorber un par de fotones en la región del infrarrojo y emitir luz en el visible (fotoluminiscencia). El interés en

estos materiales se incrementó desde la invención de la microscopia de fluorescencia por absorción de dos fotones. En la actualidad existen microscopios ópticos comerciales basados en la formación de imágenes a partir de la fluorescencia emitida por 2FA, siendo esta una nueva y poderosa herramienta en el campo de la biología celular y molecular. La propiedad de fluorescencia provocada por 2FA es un fenómeno que depende de la intensidad de la luz y esta sólo se produce en el punto focal, lo cual provoca un aumento en la resolución espacial. Además, con el uso de esta microscopia se obtiene un menor esparcimiento de la luz y por otra parte, al utilizar radiación de energía menor se reduce el daño en las células y en los fluoróforos. Se ha reportado un gran número de materiales orgánicos e inorgánicos fluorescentes como agentes de contraste para la obtención de bioimágenes, pero muy pocos en la creación de imágenes por microscopía multifotón.

El presente trabajo tiene como finalidad mostrar el desarrollo de nuevos nanomateriales orgánicos fluorescentes para microscopía multifotón, el cual es realizado por el Grupo de Propiedades Ópticas de la Materia (GPOM) del Centro de Investigaciones en Óptica (CIO). Se describirá el fenómeno y las técnicas de medición de la 2FA, además se mencionarán algunos materiales orgánicos que se han empleado para dicha aplicación. Finalmente se muestran algunos resultados que se han obtenido dentro del GPOM para esta línea de investigación.

Fenómeno de absorción de dos fotones 2FA

El proceso de absorción simultánea de dos fotones por una molécula se describió teóricamente por primera vez en los años 30s, esto lo realizó Maria Göpper-Mayer, pero fue comprobado hasta 1961, sin embargo para una molécula orgánica se realizó hasta 1963 [1]. La invención de un sistema láser que genere pulsos de luz de sub-picosegundos fue el inconveniente por el cual no se había comprobado anteriormente dicho fenómeno. De manera general, la absorción de un fotón por una molécula orgánica produce una excitación, es decir un electrón pasa de su estado basal al excitado tal como se muestra en la figura 1. La energía que requiere la molécula para este proceso es de una longitud de onda específica y está relacionada con su estructura molecular. El electrón en su estado excitado busca la manera de relajarse y lo hace mediante vibración molecular, conversiones internas (ISC) o emitiendo fotones (luminiscencia). La principal diferencia entre el proceso de absorción de un fotón (1FA) y la absorción de dos fotones (2FA) por una molécula es que este último involucra la interacción simultánea de dos fotones. El adjetivo “simultáneo” para el proceso de 2FA se utiliza para indicar que los dos fotones interactúan con la molécula dentro de un intervalo de tiempo muy corto ( $\sim 10^{-15}$ - $10^{-16}$ s) y no hay estados reales actuando como un estado intermedio en este proceso. De esta manera dicha interacción se

favorece con el uso de un láser debido a que la interacción se incrementa con el cuadrado de la intensidad de la luz. Una molécula expuesta a pulsos láser de femtosegundos está sometida a una alta intensidad de fotones lo cual favorece el proceso de absorción de dos fotones y con ello consigue el estado excitado [2].

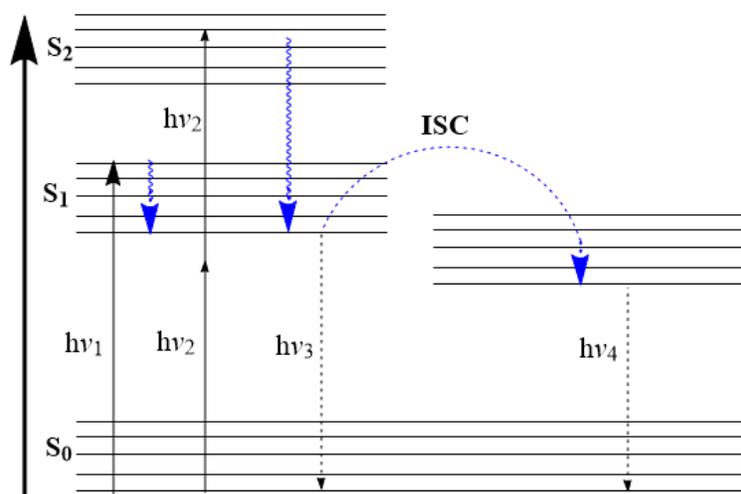


Figura 1. Procesos moleculares de absorción y emisión donde se involucran fotones  $h\nu_1$  (1FA),  $h\nu_2$  (2AF),  $h\nu_3$  (fotoluminiscencia) y  $h\nu_4$  (fosforescencia), donde S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> indican los niveles energéticos de la molécula.

### Técnicas para medir la absorción de dos fotones

Para cuantificar la magnitud del proceso de 2FA en los materiales se emplea el parámetro conocido como sección transversal ( $\sigma_{2FA}$ , expresado en unidades de Goppert-Mayer:  $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4/\text{s}/\text{fotón}$ ). Los métodos más utilizados son: el conocido como Z-scan y la fluorescencia promovida por la absorción de dos fotones (TPEF, del inglés two-photon excited fluorescence). Ambos métodos consisten en someter las muestras en solución a un haz de luz láser con pulsos de femtosegundos. La técnica de Z-scan es un método directo para determinar la absorción no lineal de materiales. Esta técnica consiste en monitorear los cambios en la transmitancia de la muestra cuando la intensidad incidente de un tren de pulsos láser cambia (esto se puede lograr modificando la posición de la muestra (posición Z) en la vecindad del plano focal de una lente, de ahí el término "Z-scan". En el Z-scan las respuestas son provocadas por los efectos térmicos y las propiedades debidas a la polarizabilidad de tercer orden de la molécula, estos no se puede separar y por lo tanto los valores de la sección transversal están sobre estimados en muchos de los casos [3].

La otra técnica empleada para medir la sección transversal es TPEF, la cual se basa en medir la intensidad del espectro de fotoluminiscencia obtenido después de ser excitada por 2FA. Los datos que se obtienen para una muestra por este método son comparados con los valores de una referencia cuyo valor de sección transversal de 2FA sea conocido para la longitud de onda empleada como excitación. La actividad bifotónica ( $\sigma_{TPE}$ ) es linealmente proporcional a  $\sigma_{2FA}$ , donde la constante de proporcionalidad es la eficiencia cuántica de fluorescencia ( $\eta$ ) de la muestra,  $\sigma_{TPE} = \eta \sigma_{2FA}$ . El arreglo experimental de la técnica se muestra en la figura 2 [4].

La principal desventaja del método TPEF es que no puede ser utilizado para materiales no fluorescentes o que presenten una fluorescencia débil. TPEF es también difícil de implementar en compuestos que exhiben emisión dependiente de la longitud de onda (ya sea en la forma de la banda o en la eficiencia), así como en muestras de estado sólido. En tales casos la utilización de Z-scans es el método más apropiado.

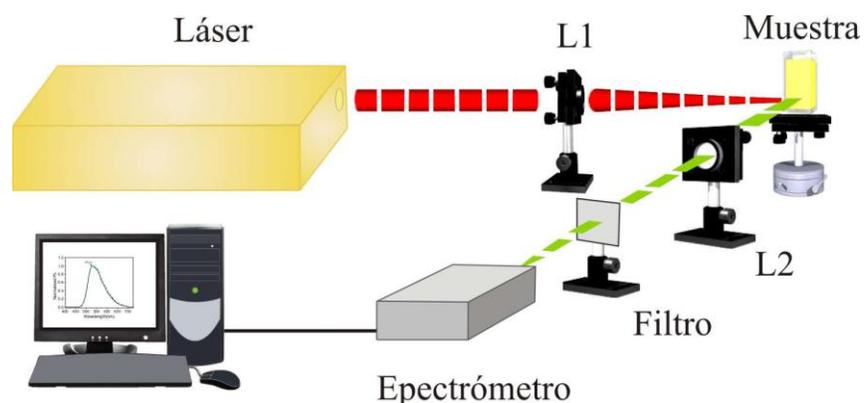


Figura 2. Arreglo experimental típico del método TPEF para medir la  $\sigma_{2FA}$  en materiales orgánicos. La fotoluminiscencia promovida por la absorción de dos fotones se obtiene utilizando una solución de la muestra bajo prueba y se compara con la de un estándar bajo las mismas condiciones experimentales.

### Diseño de materiales orgánicos

El diseño de las moléculas orgánicas que tengan la propiedad de absorción de dos fotones y sean luminiscentes es un tema de discusión. Recientemente diversos investigadores han propuesto nuevas estrategias para la ingeniería molecular de estos materiales basadas en la arquitectura electrónica. De esta manera el arreglo de los sustituyentes dentro de un sistema  $\pi$ -conjugado es el responsable de generar el fenómeno, es decir, la geometría. Para que una molécula orgánica posea la propiedad de 2FA se deben cumplir los siguientes requisitos estructurales: a) poseer un sistema  $\pi$ -conjugado de al menos 8 dobles enlaces conjugados, b) la presencia de grupos donadores y aceptores de electrones al centro y al final de la cadena y c) una banda de absorción lineal intensa. En la figura 3 se representan las arquitecturas electrónicas que se pueden conseguir en las moléculas orgánicas y que favorecen la propiedad de 2FA. La arquitectura electrónica más recurrida para incrementar la 2FA es la del tipo cuadrupolar, en dicha estructurase encuentra en el centro un grupo aceptor el cual también es un fluoróforo y en los extremos grupos donadores. Esta arquitectura se representa como D- $\pi$ -A- $\pi$ -D donde las letras D y A corresponde a los grupos donador y aceptor, respectivamente [5].

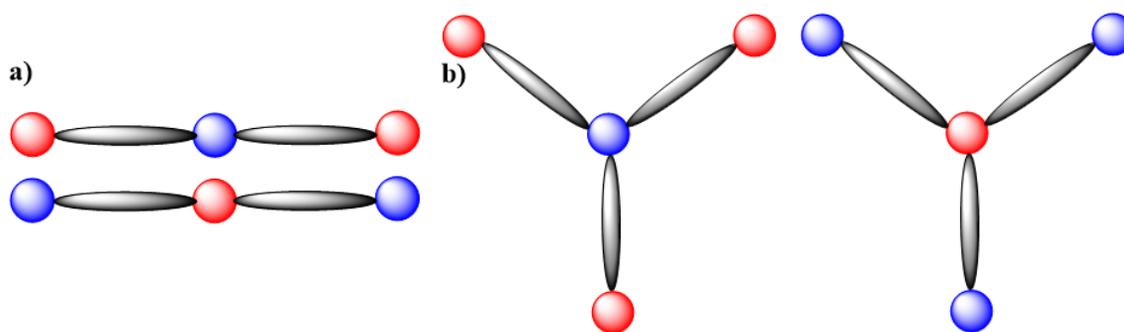


Figura 3. Arquitecturas electrónicas empleadas para el diseño de moléculas con propiedades de 2FA. a) arquitectura cuadrupolar y b) arquitectura octopolar

De acuerdo a lo descrito anteriormente, en la figura 4 se muestran algunas estructuras químicas de moléculas orgánicas que presentan la propiedad de fotoluminiscencia producida por la absorción de dos fotones. Todas ellas están reportadas, se han medido sus secciones transversales y en algunos casos se han empleado para la fabricación de biomarcadores o agentes de contraste para

microscopia multifotón [6-10]. En particular moléculas como **2**, **3** y **4** son derivados de fluorenos mientras que **1** pertenece a la familia de los BODIPY y **5** es una estructura dendrímica.

### Fabricación de nanomateriales orgánicos fluorescentes

Las moléculas orgánicas fluorescentes son en su gran mayoría insolubles en agua, mientras que en pocos casos son solubles en disolventes como DMSO. Muchas de las moléculas orgánicas que presentan fluorescencia tienen el problema de que dicha propiedad disminuye cuando se disuelven en disolventes polares próticos como el agua. En la actualidad, utilizando los principios de la nanotecnología se han procesado estas moléculas para obtener nanoestructuras que se puedan dispersar en agua (Fig. 5), conservando o incrementando sus propiedades fluorescentes. Los métodos más comunes para fabricar nanomateriales orgánicos son reprecipitación, ablación láser y microemulsión [11]. Cada una de dichas metodologías produce nanomateriales con propiedades diferentes, siendo el método de reprecipitación el más barato y fácil de realizar.

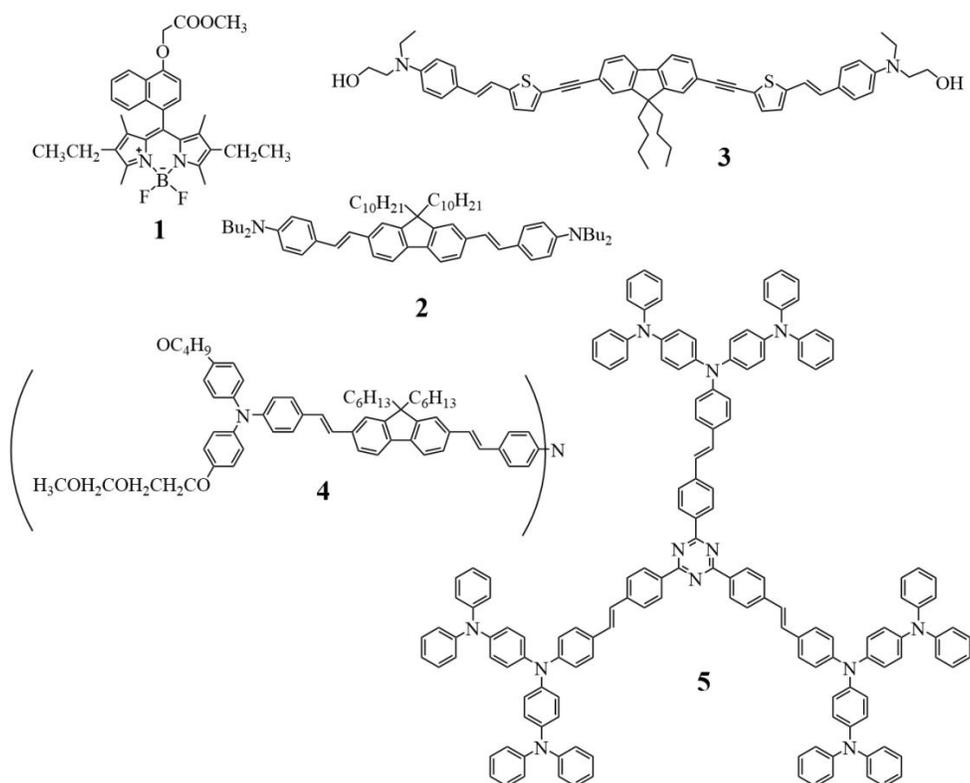


Figura 4. Estructura química de algunas moléculas fluorescentes con propiedades de 2FA.

Las nanopartículas (NPs) fabricadas con este método poseen dispersiones de tamaño considerables, las cuales son controladas por la concentración de la molécula o del surfactante, siendo éste un gran problema porque es necesario para estabilizar las NPs y en concentraciones altas es tóxico. Algunos polímeros biocompatibles tales como polímeros de etilenglicol (PEGs) se han empleado como surfactantes para estabilizar las NPs fabricadas por reprecipitación [12]. Por otro lado, con la síntesis de polímeros a partir de monómeros que presentan 2FA, se pueden obtener materiales con valores de secciones transversales mayores [13,14]. Las NPs de sílice dotadas con materiales orgánicos fluorescentes se obtienen por el método de microemulsión y ofrecen numerosas ventajas respecto a las de otros tipos de NPs, tales como estructuras bien definidas y modificables en términos de tamaño, morfología y porosidad. Además, muestran una mayor estabilidad debido a que los fluoróforos están protegidos por la capa de sílice evitando el contacto con el agua. Otra ventaja es que su superficie puede ser fácilmente modificada por biomoléculas para direccionar estas NPs hacia sitios específicos [15]. El método de ablación es una herramienta costosa debido a que se requiere el uso de un láser con pulsado. La longitud de onda de dichos pulsos debe ser cercana a la longitud de onda máxima de absorción del material, es decir, en el intervalo del espectro visible. La degradación del material y el fotoblanqueamiento son procesos adversos que se pueden presentar al usar esta metodología. Sin embargo, la dispersión del tamaño de las NPs fabricadas por este método es más pequeña, lo cual indica que se pueden obtener NPs con tamaños parecidos [16].

### NPs y sus métodos de fabricación

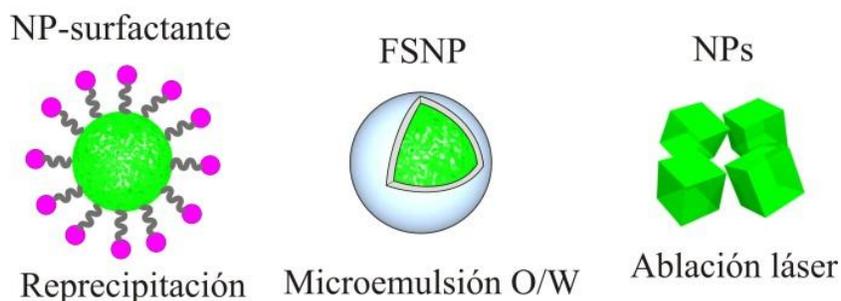


Figura 5. Tipos de métodos para fabricar nanoestructuras a partir de moléculas orgánicas.

### **Ejemplos de materiales orgánicos fluorescentes empleado para la formación de bioimágenes**

En la literatura existen un gran número de materiales fluorescentes que se han empleado como agentes de contraste para la formación de bioimágenes. Desde moléculas de bajo peso molecular como derivados de fluoreno [17], complejos de boro [18], cumarinas [19] o rodaminas [20], y hasta algunos polímeros conjugados [21], todos ellos fluorescentes y en particular con arquitectura cuadrupolar. La manera en la cual son empleados estos materiales es en solución (DMSO: H<sub>2</sub>O) con concentraciones de colorante del 1 al 5%, otra forma es fabricando nanoestructuras estabilizadas por surfactantes (encapsulación) o NPs recubiertas por sílice. De manera general, la fabricación de nanopartículas orgánicas fluorescentes ha abierto la posibilidad de emplear estos materiales para microscopía multifotón, lo cual anteriormente estaba limitado por la poca compatibilidad con el agua de la mayoría de estos materiales.

### **Discusión de resultados**

Como parte de nuestra línea de investigación, estamos interesados en el diseño de materiales orgánicos fluorescentes que posean arquitectura cuadrupolar para favorecer la propiedad de 2FA. De manera general, nuestros derivados se basan en el uso del fluoróforo benzothiadiazol como grupo aceptor al centro de nuestras moléculas y en los extremos grupos donadores tales como fluorenos. Además, se agregan cadenas alquílicas en la estructura de la molécula para favorecer la hidrofobicidad, característica que es requerida en la fabricación de los nanomateriales (Fig. 6) [22,23]. Este tipo de modificaciones estructurales las realizamos en colaboración con investigadores de algunas otras instituciones como el Instituto de Materiales de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV).



Figura 6. Fotografía bajo excitación de una lámpara de luz ultravioleta de una molécula fluorescente en solución en distintos disolventes.

De manera general en la figura 7 se muestra un esquema del trabajo realizado por el GPOM dentro de esta línea de investigación, el cual incluye el diseño de los materiales, la síntesis, la caracterización de sus propiedades y su evaluación como agentes de contraste.

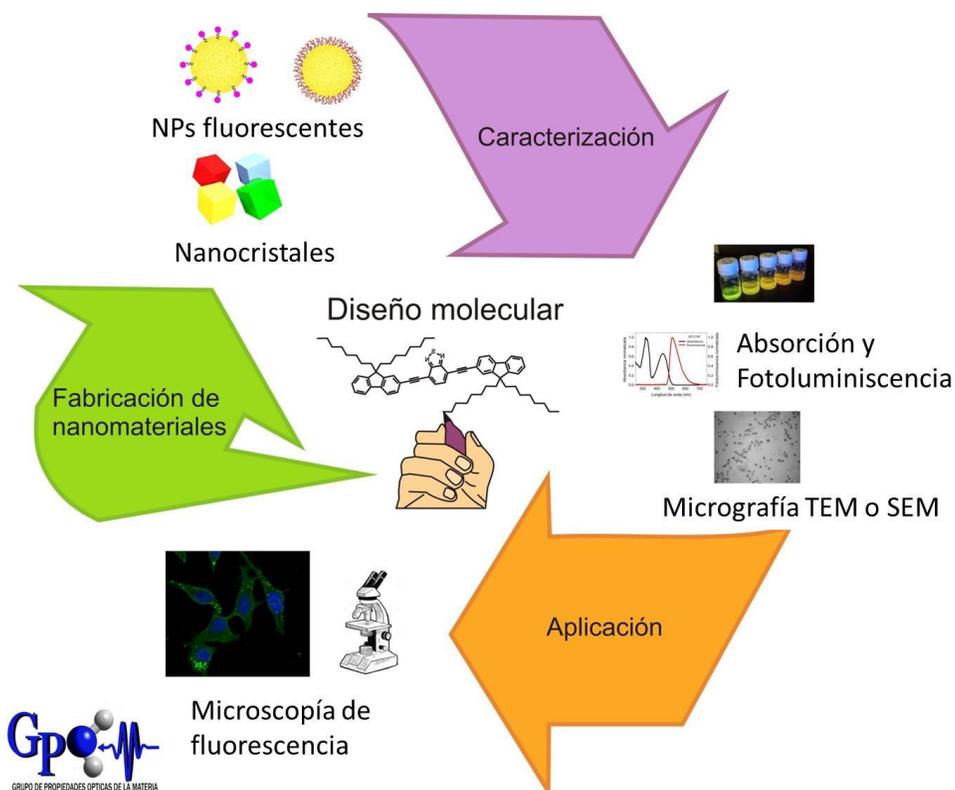


Figura 7. Representación del trabajo de investigación realizado por el Grupo de Propiedades Ópticas de la Materia (GPOM).

Como primer paso en el diseño molecular es importante mantener una arquitectura cuadrupolar del tipo D- $\pi$ -A- $\pi$ -D. Mediante reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio se realiza la síntesis de estas moléculas. La caracterización de las propiedades ópticas como absorción, emisión y eficiencia cuántica tanto en solución como en estado sólido se realiza con el equipo y los arreglos ópticos que posee el GPOM. La fabricación de los nanomateriales es el paso principal en el desarrollo de nuestros agentes de contraste, con modificaciones a las metodologías que se encuentran reportadas en la literatura tales como reprecipitación y microemulsión podemos crear nuestras NPs. Por el

método de reprecipitación hemos preparado materiales con tamaños de 50-120 nm, los cuales se estabilizan con surfactantes como CTAB o TRITON X-100. Se observa que estos materiales conservan sus propiedades luminiscentes. Por el método de microemulsión se fabricaron esferas de sílice dopadas con los fluoróforos, obteniendo NPs con tamaños de entre 30-70 nm, la superficie de las esferas esta funcionalizada con grupos  $-(CH_2)_3-NH_2$ , los cuales más adelante se emplearán para bioconjuguar los nanomateriales. Por otro lado, los materiales que se fabrican por ablación láser tienen tamaños más pequeños de entre 20 a 50 nm, la problemática es la concentración con las que se fabricaron ya que son relativamente bajas comparadas con las obtenidas por los otros métodos. La caracterización óptica lineal se realizó adquiriendo los espectros de absorción, emisión y eficiencias cuánticas en suspensión (Fig. 8). La fotoestabilidad de las suspensiones se evaluó por espectroscopía de absorción y emisión, los resultados de estabilidad mostraron que la molécula en solución es muy inestable, en particular, aquella preparada con un disolvente polar, es más fotoestable en comparación la molécula en suspensión (nanoestructurado). Finalmente, se evaluó la sección transversal de los materiales en solución y suspensión por el método de TPEF, los valores obtenidos mostraron que para las soluciones los valores son de 100 a 10000 GM mientras que para las suspensiones de NPs los valores son de 100 a 8000 GM.

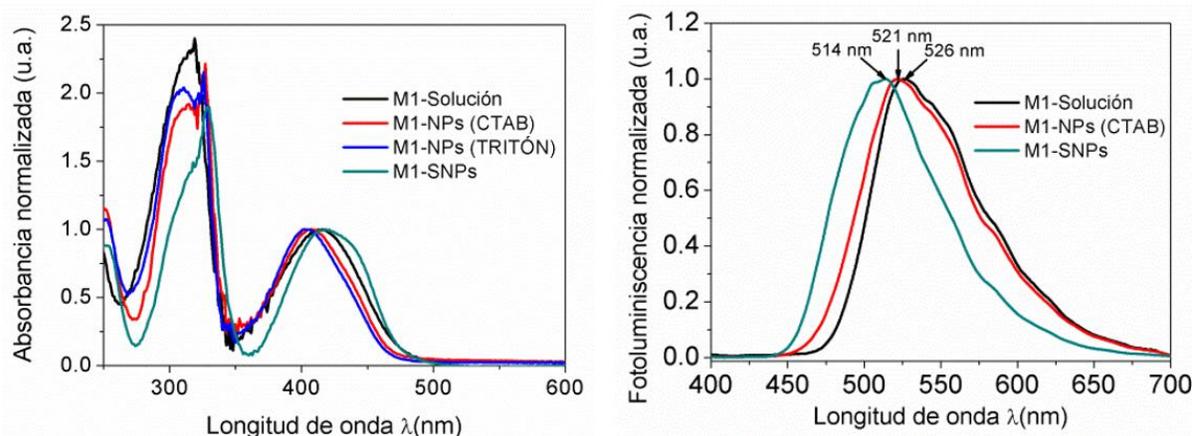


Figura 8. Espectros de absorción y emisión de nuestros materiales en solución y suspensión de NPs.

Los nanomateriales fabricados se emplearon como agentes de contraste en microscopia de fluorescencia producida por 1FA y 2FA. Se tiñeron células HeLa con la suspensión acuosa de nuestros fluoróforos. En estas muestras, los núcleos

de las células se marcaron con la sonda fluorescente Hoechst 33258. Para el caso de excitación con un fotón las células se iluminaron con una longitud de onda de 488 nm, mientras que para obtener las micrografías por medio de dos fotones se utilizó una iluminación a 740 nm. Para mayor claridad, las imágenes se tomaron con filtros verdes y azules para identificar nanopartículas (columna izquierda) y el núcleo (columna central), respectivamente (Fig. 9). Es importante resaltar que no fue posible obtener una micrografía del núcleo de las células bajo iluminación en 740 nm, ya que este colorante comercial tiene una escasa actividad bifotónica a esta longitud de onda. A partir de las micrografías obtenidas se observó que nuestras NPs penetraron al citoplasma de manera inespecífica, por lo que actualmente nos encontramos trabajando en la bioconjugación de las NPs.

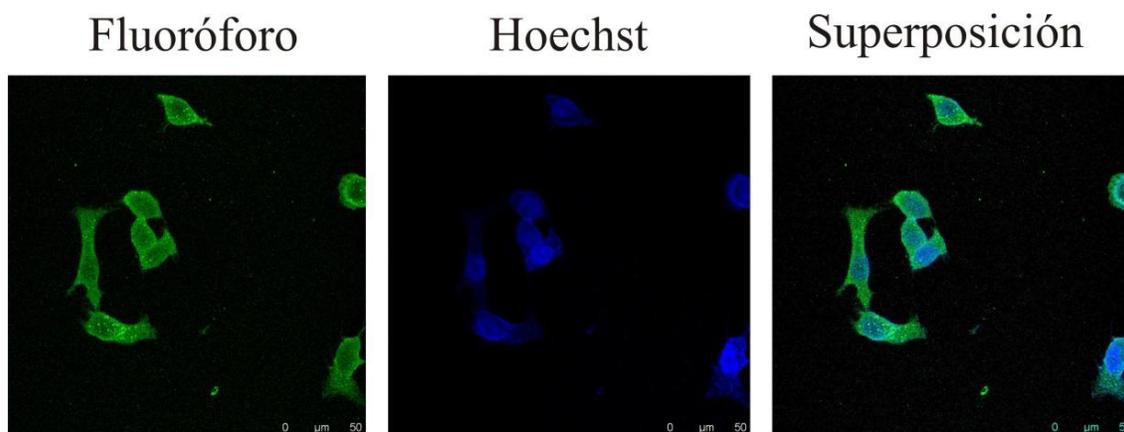


Figura 9. Micrografías de células HeLa teñidas con nuestras NPs obtenidas por microscopia multifotón.

### Conclusiones

Usando el diseño molecular se sintetizaron nuevas moléculas orgánicas fluorescentes con arquitectura cuadrupolar, para favorecer las propiedades de absorción de dos fotones. Las propiedades estructurales de dichas moléculas se aprovecharon para fabricar nanomateriales por los métodos de reprecipitación y microemulsión. Las secciones transversales de estas moléculas se midieron por el método de TPEF en solución y suspensión de nanoestructuras. Las suspensiones acuosas de estos nanomateriales se emplearon para teñir células HeLa y las micrografías se obtuvieron con un microscopio multifotón. Los resultados mostraron que estos nanomateriales tienen actividades bifotónicas aceptables

para ser empleados como agentes de contraste y además presentan buena foto-estabilidad.

## Referencias

1. Göppert-Mayer, M. (1931) *Ann. Phys.* **401**, 273–294.
2. Pawlicki, M., Collins, H.A., Denning R.G., Anderson H.L. (2009) *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 3244–3266
3. Sheik-Bahae, M., Said, A.A., Wei, T.-H., et al. (1990) *IEEE J. Quantum Electron.* **26**, 760–769. b) Kamada, K., Matsunaga, A., Yoshino, K. (2003) *J. Opt. Soc. Am. B.* **20**, 529–537
4. Xu, C., Webb, W.W., (1996) *J. Opt. Soc. Am. B.* **13**, 481 – 491.
5. Myung Kim, H. Rae Cho, B. (2009) *Chem. Commun.* 153–164
6. Fang, H.H., Chen, Q.D., Yang, J., et al. (2010) *Opt. Lett.* **35**, 441-443.b)
7. Ehrlich, J.E., Wu, X.L., Lee, I.-Y.S., et al. (1997) *Opt. Lett.* **22**, 1843-1845.
8. Kim, S., Pudavar, H.E., Bonoiu, A., Prasad, P.N. (2007) *Adv. Mater.* **19**, 3791-3795.
9. Huang, C., Lin, C., Ren, A., Yang, N. (2011) *J. Mol. Structure*, **1006**, 91-95.
10. Tan, Y., Zhang, Q., Yu, J., et al. (2013) *Dyes and Pigments*, **97**, 58-64.
11. Sheng, Y. Fu, H. Peng, A. Ma, et al. (2008) *J. Adv. Mater.* **20**, 2859-2876.
12. Zhao, Z., Chen, B., Geng, J., et al. (2014) *Part. Part. Syst. Charact.* **31**, 481–491.
13. Joralemon, M.J., Mcrae, S., Emrick, T., (2010) *Chem. Commun.* **46**, 1377–1393.
14. Gaucher, G., Marchessault, R.H., Leroux, J.C. (2010) *J. Controlled Release*, **143**, 2–12.
15. Caltagirone, C., Bettoschi, A., Garau, A., Montis, R., (2015) *Chem. Soc. Rev.* DOI: 10.1039/C4CS00270A
16. Asahi, T., Sugiyama, T., Masuhara, H. (2008) *Acc. Chem. Res.* **41**, 1790–1798.
17. Yao, S., Ahn, H.-Y., Wang, X, et al. (2010) *J. Org. Chem.* **75**, 3965–3974.
18. Zheng, Q., Xu, G., Prasad, P.N., (2008) *Chem. Eur. J.* **14**, 5812–5819.
19. Gagey, N., Neveu, P., Jullien, L. (2007) *Angew. Chem.* **119**, 2519–2521.
20. Miller, E.W., Albers, A.E., Pralle, A., (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 16652–16659.
21. Li, K. Liu, B. (2012) *J. Mater. Chem.* **22**, 1257
22. Aparicio-Ixta, L., Ramos-Ortiz, G., Pichardo-Molina, J. et al. (2012) *Nanoscale*. **4**, 7751-7759.
23. Rodríguez-Romero, J., Aparicio-Ixta, L., Rodríguez, M., et al. (2013) *Dyes and Pigments*. **98**, 31-41.

### **Semblanza del Dr. Mario A. Rodríguez Rivera.**



El Dr. Mario A. Rodríguez Rivera obtuvo el título de Químico Industrial por la Universidad Veracruzana en el 2001, consiguió el grado de Doctor en Ciencias Químicas en el departamento de Química de CINVESTAV-IPN en el 2007, es miembro del SNI nivel I desde el año 2009. Realizó una estancia postdoctoral en el Centro de Investigaciones en Óptica A.C. (CIO) en el 2008 dentro del Grupo de las

Propiedades Ópticas de la Materia (GPOM), así mismo, realizó una estancia predoctoral y posdoctoral en el Laboratoire de photophysique et photochimie supramoléculaires et macromoléculaires (PPSM) de la Escuela Normal Superior de Cachan (Francia) en el 2005 y 2009, respectivamente. Realizó una estancia de investigación en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Madrid en 2011. Ha publicado un total de 30 artículos científicos en revistas internacionales con riguroso arbitraje (290 citas, con H-index de 9). Ha publicado varios artículos de divulgación en diarios locales y revistas nacionales. Ha dirigido un total de 14 tesis de licenciatura y 2 de maestría, actualmente se encuentran en proceso 2 tesis de doctorado. Sus líneas de investigación se relacionan con el diseño, la síntesis, caracterización química y óptica de moléculas orgánicas para su aplicación en la fabricación de dispositivos fotónicos y opto-electrónicos tales como celdas solares, polímeros fotorrefractivos, cristales con propiedades no lineales, sensores químicos, materiales con propiedades de absorción de dos fotones (TPA), nanopartículas y nanocristales orgánicos.



Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 19-40, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## MICROSCOPIA CONFOCAL: APORTES AL ESTUDIO DE LOS EPITELIOS

### CONFOCAL MICROSCOPY: CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF EPITHELIA

Contreras Patiño Rubén G<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados, Cinvestav. Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, CP 07360, México D. F

rcontrer@fisio.cinvestav.mx 57 47 38 00 ext 5192

### RESUMEN

La capacidad de distinguir detalles de un espécimen con un microscopio está limitada por la difracción de los fotones, que impide distinguir puntos independientes a distancias menores a la mitad de la longitud de onda de los fotones usados en la observación. Esto se conoce como el límite de Abbe. La microscopía confocal permite alcanzar el límite de Abbe e investigar las dos características principales de las células epiteliales: la adhesión de células vecinas entre sí con uniones ocluseras y la diferenciación de su membrana plasmática en dominios distintos, propiedad conocida como polarización celular. Demostramos que el factor de crecimiento epidérmico, y concentraciones muy bajas de la hormona ouabaína, inducen la formación de uniones ocluseras más herméticas y aceleran la polarización de la membrana plasmática; y que concentraciones altas de ouabaína inducen la degradación de las uniones ocluseras. Estos procesos

dependen de la activación de las cinasas Src y ERK1/2 y del envío al núcleo de la proteína STAT3, en el caso del factor, o de la  $\beta$ -catenina, en el de la hormona. Ahora necesitamos de microscopías de super-resolución para estudiar complejos multi-proteicos y proteínas únicas en células vivas.

**Palabras clave:** Uniones estrechas, microscopía confocal, epitelios, EGF ouabaína.

### **ABSTRACT**

The ability to discern details of a specimen in a microscope is limited by diffraction of the photons that impairs the distinction of independent points separated distances lower than a half the value of the wave length of the photons used for the observation. This is known as Abbe's limit. The confocal microscopy enables the researchers to reach Abbe's limit and investigate the two main characteristics of epithelial cells: the adhesion of neighboring cells with occluding junctions and the differentiation of the plasma membrane in different domains, property known as cell polarization. We showed that the epidermal growth factor, or a very low concentration of the hormone ouabain, induces the formation of hermetic occluding junctions and accelerates the polarization of the plasma membrane; and that high ouabain concentrations trigger the degradation of occluding junctions. These processes depend on the activation of Src and ERK1/2 kinases and on the delivery, into the nucleus of the proteins STAT3, in the case of the growth factor, or  $\beta$ -catenin, for the hormone. We now require super-resolution microscopies, able to brake Abbe's limit that allow us to study the dynamics of multi-protein complexes and a single protein in alive cells.

**Keywords:** Tight junctions, confocal microscopy, epithelia, EGF, ouabain.

### **El microscopio de luz**

Así como la ciencia moderna ha producido una cantidad enorme de instrumentos en beneficio del ser humano, también ha necesitado de la invención de dispositivos complejos para progresar. Los microscopios modernos son unos de estos dispositivos, con ellos se capturan las partículas de la luz o fotones a partir de los cuales conocemos la estructura y función de las células y los tejidos.

Se acepta que el primer microscopio fue construido por el belga Zacharias Janssen a finales del siglo XVI. Consistía de un lente biconvexo y otro plano-convexo, montados en tubos que se deslizaban para enfocar el espécimen [1].

Desafortunadamente, no se conservan esquemas de las observaciones hechas con este dispositivo. En la segunda mitad del siglo XVII y principios del XVIII, el holandés Anton van Leeuwenhoek construyó microscopios de una sola lente biconvexa pequeña, extraordinariamente bien pulida, con los que describió los “*animáculos*”, que ahora reconocemos como microorganismos [2-4]. Estas descripciones abrieron un campo de investigación hasta entonces desconocido, la **microscopía**, que despertó el interés de gran parte de la comunidad científica luego de la publicación de “*Micrographia*” por el inglés Robert Hooke [5], obra que confirma las observaciones de Leeuwenhoek y describe a las “*células*” como los espacios contenidos entre una malla de paredes en un corte delgado de corcho.

La mecánica y óptica de los microscopios continuó desarrollándose en el periodo comprendido entre los siglos XVIII y mediados del XX, hasta obtener la arquitectura característica del microscopio compuesto moderno, también conocido como “*microscopio de campo brillante*”. Ejemplos de estos instrumentos son los construidos por Charles A. Clark en Estados Unidos y Karl Zeiss en Alemania, que corrigen distorsiones del color y forma conocidas como “aberraciones acromática y esférica”, respectivamente. Dos avances de este periodo son particularmente cruciales: el desarrollo de la teoría del límite de resolución por Ernst Abbe [6] y del sistema de iluminación por August Köhler [7].

Según Abbe, la resolución ( $R$ ) o distancia mínima a la que se puede distinguir dos puntos separados como entidades distintas, depende de la longitud de onda de la luz (o fotones) con la que se ilumina el espécimen ( $\lambda$ ) y de la apertura numérica ( $NA$ ) que, a su vez, es el producto del índice de refracción ( $n$ ) del lente, el índice de refracción del condensador (casi idéntico a  $n$ ) y el seno del ángulo con el que incide el haz de luz de iluminación ( $\alpha$ ), de manera que:

$$R = \lambda / (2n \sin\alpha) = \lambda / (2 n AN)$$

Por ejemplo, aún en condiciones óptimas, usando lentes de la máxima calidad, una  $AN$  de 1, iluminación y alineamiento perfectos, y luz verde de 500 nm de  $\lambda$ , un microscopio tendría una  $R$  de 250 nm. Esto significa que dos objetos separados por menos de 250 nm, más o menos el grosor de 50 membranas biológicas apiladas, serían observados como si fueran uno solo.

El sistema de iluminación por August Köhler aproximó la  $R$  al límite de Abbe, introduciendo un sistema y un protocolo de alineamiento que eliminó la iluminación dispersa del espécimen. En la realidad, las condiciones óptimas de trabajo son

difíciles de alcanzar, por lo que  $R$  aumenta usualmente hasta unos 600 nm, aún en los mejores equipos y con los usuarios más experimentados. Por eso es necesario aumentar el contraste, ya sea iluminando de manera especial al espécimen o tiñendo, para observar mayor detalle. Las técnicas más usadas en la investigación actual son el *contraste de fases* [8, 9] y la *inmunofluorescencia* [10]. En el contraste de fases se reduce la iluminación directa y amplifica la difractada por el espécimen y es muy útil para observar células vivas sin teñir. La inmunofluorescencia aumenta el contraste del espécimen mediante el truco de unirle a éste unas sustancias que produce un tipo particular de fotones, proceso denominado fluorescencia, de manera que la célula es oscura, excepto en las estructuras que unieron esta sustancia.

### Inmunofluorescencia

La figura 1 esquematiza la producción de fluorescencia a nivel atómico. Un electrón en su estado basal puede ser “*estimulado*” si choca con un fotón y lo “*absorbe*”. El electrón se *energiza* y asciende a un orbital superior para regresar espontáneamente a su nivel basal *emitiendo* un fotón de menor  $\lambda$  que el estimulador. Las sustancias que producen fluorescencia se denominan fluoróforos y los más comunes en microscopía se muestran (Fig. 2) [10].

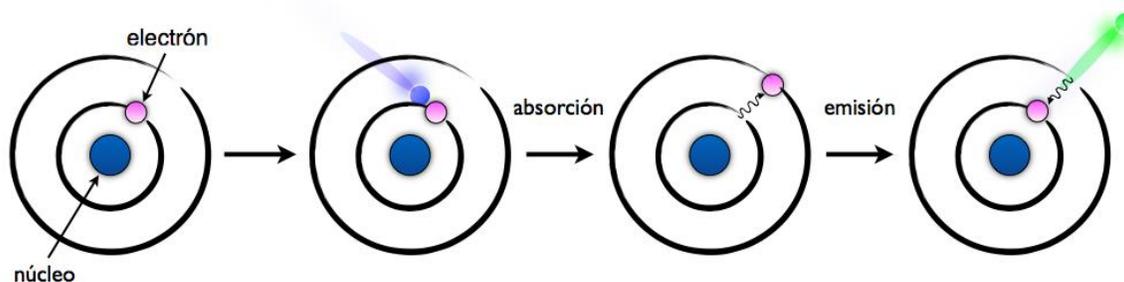


Figura 1. La fluorescencia. Se esquematiza un átomo simple con su núcleo en azul, un electrón en rosa y los orbitales basal y excitado del ese electrón representados por las circunferencias negras. Los colores de los fotones corresponden al caso en que el fluoróforo es fluoresceína (FITC).

La fluorescencia permite localizar con precisión los componentes celulares, usualmente proteínas, que se puede observar en la célula viva si se expresa fusionada a una proteína fluorescente [11], o en células fijadas si se le une un

fluoróforo [12]. La fijación consiste en entrecruzar los grupos químicos laterales de las proteínas con reactivos bifuncionales como el paraformaldehído, produciendo una “malla” molecular que estabiliza y conserva la estructura celular [13].

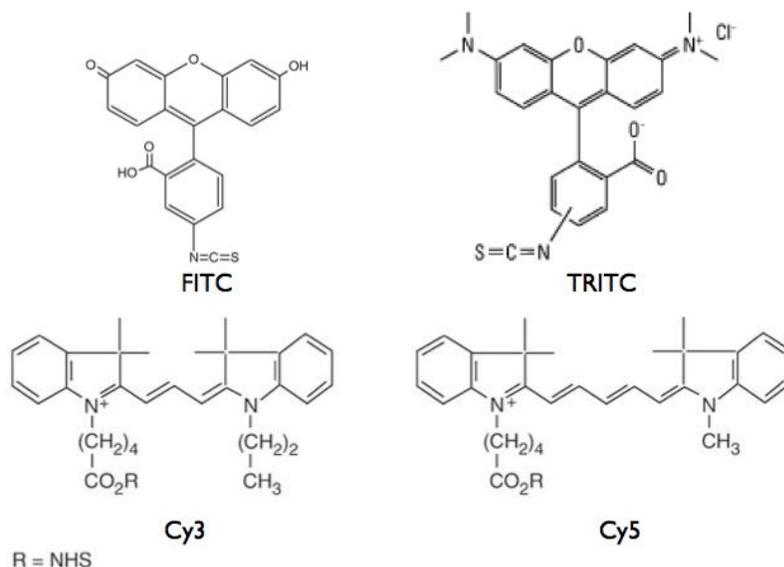


Figura 2. Fluoróforos de uso común. El Isotiocianato de fluoresceína (FITC) se excita al máximo (EX) con fotones azules ( $\lambda_{EX}$  de 488 nm) y emite al máximo (EM) fotones verdes ( $\lambda_{EM}$  de 510 nm). El isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) tiene una  $\lambda_{EX}$  de 530 (verde) y una  $\lambda_{EM}$  de 620 nm (naranja). El CY3 tiene características similares a la TRITC y el CY5 tiene una  $\lambda_{EX}$  de 640 nm (rojo) y una  $\lambda_{EM}$  de 750 nm (infrarojo) que no se puede ver directamente.

El espécimen teñido con fluoróforos se observa entonces en el microscopio de fluorescencia (Fig. 3). La iluminación constante del espécimen con haces de luz potentes, durante el periodo de observación, produce el “apagamiento” del fluoróforo, donde éste adopta una conformación imposible de excitar. La inmunofluorescencia convencional es muy útil en la investigación biológica pero no permite resolver los complejos proteicos responsables del funcionamiento celular [14].

### El microscopio confocal de barrido láser

El inconveniente principal del microscopio de fluorescencia consiste en que los fotones provenientes del plano enfocado, o plano focal, se observan junto con los que provienen de otros planos del espécimen, del medio en el que éste se monta y del portaobjetos y cubreobjetos usados en el montaje. Estos fotones “desenfocados” hacen que la imagen se vea borrosa y con una luz de “fondo”.

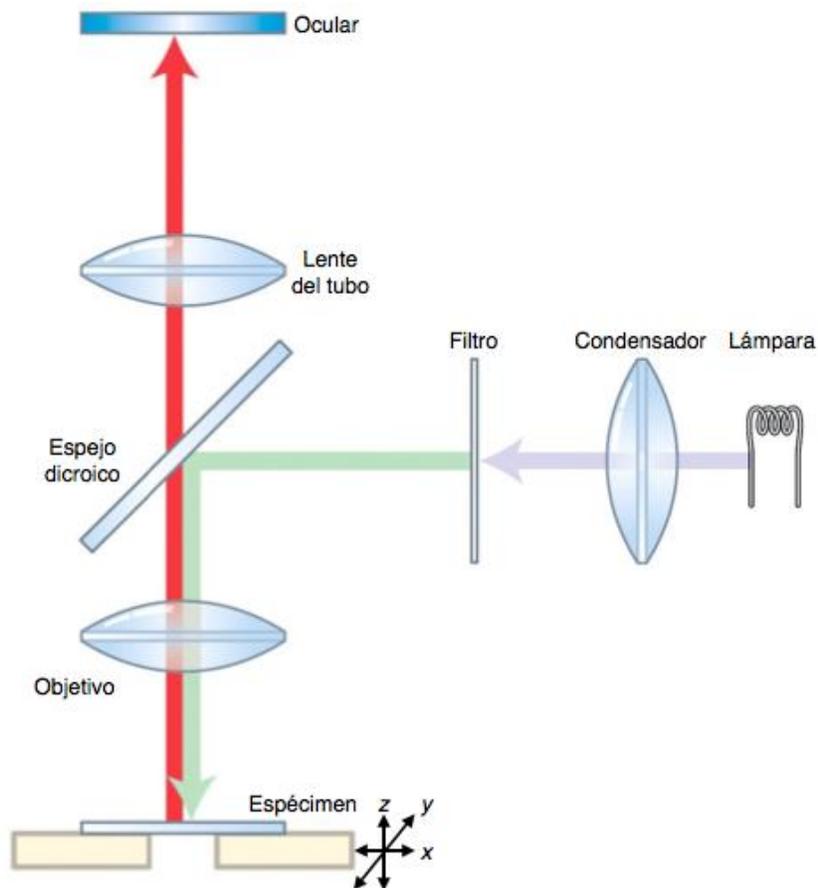


Figura 3. Vía de luz de un microscopio de fluorescencia. Se esquematiza el caso de la rodamina.

El primer intento de eliminar los fotones desenfocados lo realizó el oftalmólogo suizo Hans Goldman en 1940 que agregó al microscopio con el que veía la retina de los pacientes, una placa con una rendija antes del ocular. La placa bloqueaba los fotones desenfocados y la rendija dejaba pasar los enfocados. El microscopio del checo Mojmír Petráň, patentado en 1967, tenía un disco con dos agujeros (disco Nipkow), a través de los cuales hacía pasar, por uno de ellos, los fotones enfocados para iluminar el espécimen y por otro, situado al extremo opuesto, la fluorescencia producida en el plano focal, mientras el resto de la pared del disco bloqueaba la fluorescencia desenfocada.

El primer microscopio confocal de barrido fue construido por el norteamericano Marvin Minsky, del Instituto Tecnológico de Massachusetts, en 1955 y la característica básica de su diseño fue la introducción de dos diafragmas

(*pinholes*, en inglés) en posiciones específicas de la vía de iluminación que forma la imagen, de ahí el nombre de “*confocal*” [15]. El primer diafragma se ubicaba después de la lámpara y podía fijársele una apertura óptima que producía un haz de iluminación muy enfocado que se dirigía al punto del espécimen que se observa. El segundo diafragma se ubicaba antes del detector de fotones que consistía de un tubo fotomultiplicador. La apertura de éste diafragma se regulaba de manera que bloqueara los fotones emitidos por el espécimen fuera del plano focal, pero dejara pasar los provenientes del punto observado. Luego se movía el espécimen para obtener la información de otros puntos aledaños y se reconstruía la imagen en un dispositivo electrónico. Desafortunadamente no se conservan ni se publicaron imágenes obtenidas con este microscopio. Varios prototipos se desarrollaron y usaron en la investigación en los años subsecuentes, introduciendo mejoras como el enfoque automático, la iluminación con láser, el uso de las computadoras y los monitores y el barrido con del láser, hasta que se dispuso del primer confocal comercial, el SOM-25, fabricado por Oxford Optoelectronics. La compañía Bio-Rad compró la patente y fabricó el MRC 500 a mediados de la década de los 80s del siglo pasado, el primer microscopio confocal comercial de amplia distribución.

La vía de luz de un microscopio confocal de barrido moderno se muestra (Fig. 4). Para obtener una imagen con el microscopio confocal, deben capturarse los fotones que provienen de una pequeña región (un punto) en el plano focal, luego se mueve el láser a la región vecina y se repite el proceso hasta obtener la información suficiente para una imagen. Moviendo el tornillo micrométrico se desplaza la platina con el espécimen para capturar la información de varios planos adyacentes. Con la localización precisa y el número de fotones capturados, se reconstruye la imagen en una computadora. Cada región pequeña se representa en la imagen como un cuadro pequeño, llamado pixel, cuyo color e intensidad está dado por el tipo y número de fotones capturados.

El microscopio confocal produce imágenes con resoluciones máximas, en el plano  $xy$ , de unos 250-300 nm, que alcanzan el límite de Abbe y, gracias a la disposición de láseres nuevos, al aumento de sensibilidad de los detectores y de los motores y al desarrollo de gran variedad de fluoróforos, se puede trabajar con las células vivas y estudiar estructuras más pequeñas. No obstante, la resolución en el plano  $z$  es todavía muy baja (500-700 nm).

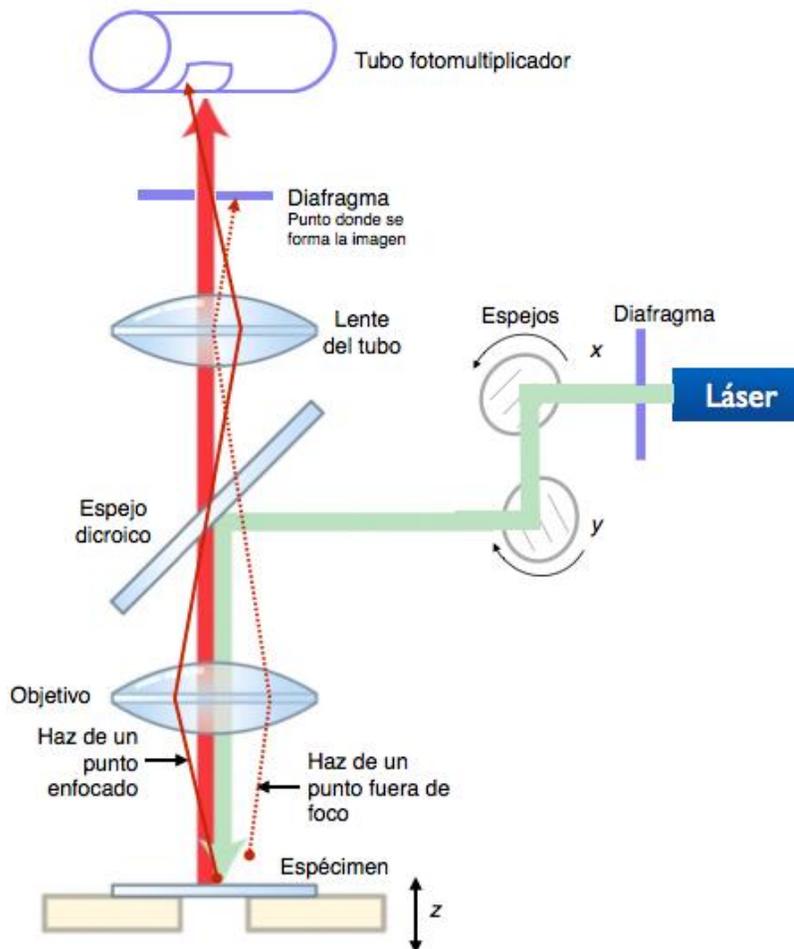


Figura 4. Microscopio confocal de barrido láser moderno. El láser produce una iluminación muy intensa, coherente y de una  $\lambda$  precisa (línea verde gruesa, color que corresponde a la  $\lambda_{EX}$  de la rodamina). El barrido en los ejes  $x$  y  $y$  se realiza moviendo el haz láser con espejos montados en motores pequeños y el  $z$  con otro motor que controla la altura de la platina. Los detectores modernos son tubos foto-multiplicadores de altísima eficiencia. Los diafragmas (líneas moradas) se colocan en posiciones específicas: entre la fuente láser y el espejo dicroico y antes del detector. Al cerrar los diafragmas se obtiene un haz de luz cuyo diámetro se puede reducir hasta tener unos 250 nM de diámetro. Los fotones emitidos desde el punto enfocado (línea roja delgada continua) pasan al detector, pero los desenfocados (línea roja discontinua) se bloquean.

Aun alcanzando el límite de Abbe en el plano  $xy$ , la resolución es insuficiente para estudiar las nanoestructuras importantes en las células. Un desarrollo posterior del microscopio confocal fue la variante multifotónica.

### El microscopio confocal de barrido láser multifotónico

El fenómeno físico en el que se basa el láser fue predicho por el alemán Albert Einstein en 1916, quien propuso que los fotones pueden “*amplificarse*” mediante la “*emisión estimulada*” de la radiación (Fig. 5) [16]. Una molécula “*absorbe*” la energía que se le “*bombea*” y uno de sus electrones asciende a un orbital superior. Si en este momento el electrón absorbe un fotón, regresa al nivel basal emitiendo dos fotones idénticos “*en fase*”, es decir, que se mueven exactamente en un mismo frente y, si se representan como ondas, sus crestas y valles coinciden, por lo que interactúan constructivamente y se *amplifican*.

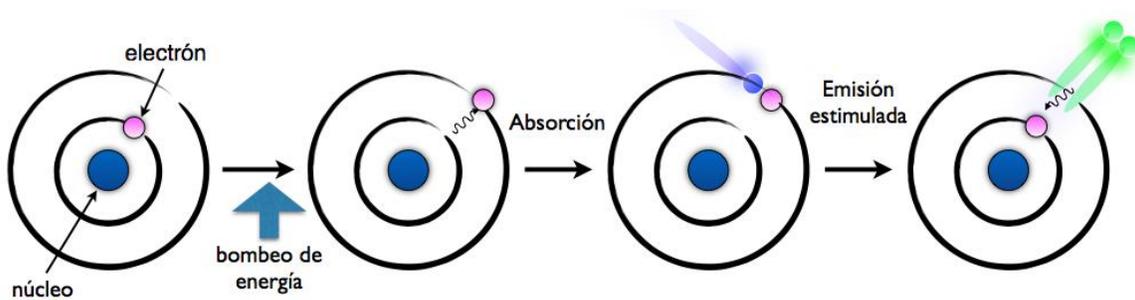


Figura 5. El fenómeno de emisión estimulada.

La descripción de la emisión estimulada permitió concebir dispositivos como el *Máser*, que producía un haz potente y coherente de microondas, y el *Láser*, que producía luz roja e inicialmente fue construido con una varilla de rubí la que se le bombeaba energía con una lámpara de centelleo [17]. Para producir el haz láser (Fig. 6), se bombea energía al material confinado, por ejemplo un gas. Éste absorbe la energía y sus electrones se excitan. Cuando espontáneamente uno de ellos regresa al estado basal, emite un fotón que a su vez, estimula a una molécula de gas excitada vecina. Los electrones de esta molécula regresan al nivel basal emitiendo dos fotones *en fase* y coherentes. Un espejo en un extremo del recipiente refleja los fotones producidos y otro, semitransparente en el extremo opuesto, los deja emerger en un haz potente [18].

Los láseres continuos producen fotones amplificados todo el tiempo. En los láseres denominados “*pulsados*”, la producción de fotones se realiza en ciclos de femtosegundos, por lo que se desplazan en un mismo frente. Esto aumenta la probabilidad de que dos o más fotones impacten simultáneamente a un electrón de un fluoróforo, que regresa a su estado basal emitiendo un fotón fluorescente (Fig.7).

En el microscopio multifotónico el espécimen se excita con fotones infrarrojos que provienen de láseres pulsados. Los lentes del objetivo acercan más estos fotones entre sí y aumentan la probabilidad de que dos (o más) de ellos impacten simultáneamente al fluoróforo en el espécimen y se produzca el efecto multifotónico. El área donde este fenómeno se presenta es un cono muy pequeño (Fig. 8) en el plano focal, por lo que no se produce fluorescencia desenfocada y no se requieren diafragmas bloqueadores. Los fotones infrarrojos tienen baja energía y no rompen los enlaces de las biomoléculas, por lo que son ideales para trabajar con células vivas. Además, el apagamiento de la fluorescencia es menor.

Hoy en día existen fluoróforos con propiedades sorprendentes, como fluorescer solamente unido a una sustancia u organelo específico [19]. El microscopio multifotónico ha llevado la resolución al límite de Abbe y es gentil con las células vivas, por lo que se usa ampliamente. Sin embargo, no rompe el límite de Abbe y no es útil para estudiar las nanoestructuras en células vivas que subyacen al funcionamiento celular.

### Microscopios de súper-resolución

Los intentos por romper el límite de Abbe incluyen instrumentos como los microscopios de campo cercano, entre los que destaca el de efecto túnel [20]. Este microscopio recorre la superficie del espécimen con una molécula que sobresale de una punta de metal fina y alcanza una resolución suficiente para observar macromoléculas independientes, pero no es útil para observar el interior de células intactas y es relativamente lento. Los microscopios con más impacto en la investigación moderna de las células han sido el confocal STED y el STORM.

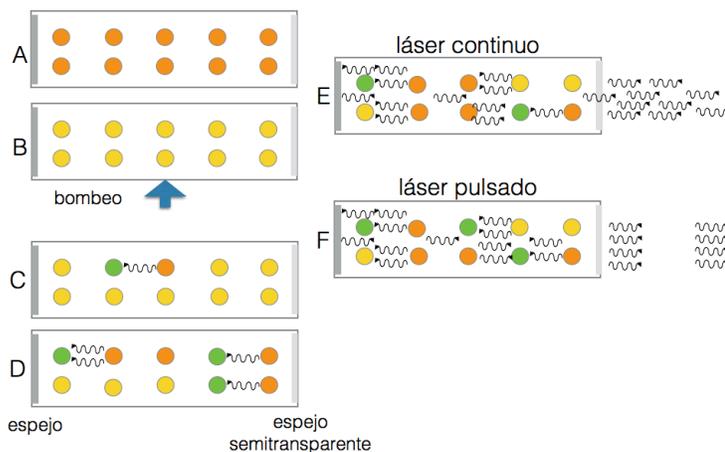


Figura 6. El láser. LASER es el acrónimo de "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation". Las moléculas en el estado basal de ciertos materiales (rubí, semiconductores,

gases, A, círculos naranjas), absorben la energía bombeada al sistema mediante centellas potentes o corrientes eléctricas intensas con grandes diferencias de potencial (B, círculos amarillos). Un electrón excitado regresa espontáneamente a su estado basal, emitiendo un fotón (onda negra pequeña) que puede impactar a otro electrón excitado de otra molécula estimulada vecina (C, círculo verde). La molécula doblemente excitada regresa al estado basal emitiendo dos fotones (D). Se desata una reacción en cadena productora de fotones en fase que son reflejados por espejos. Dado que uno de ellos es parcialmente transparente, permite que emerja un haz potente y coherente de luz. En los láseres continuos (E) el bombeo se produce constantemente fotones, en los pulsados (F), los fotones se producen en frentes por lo que, además de ser coherentes, se desplazan en el mismo plano.

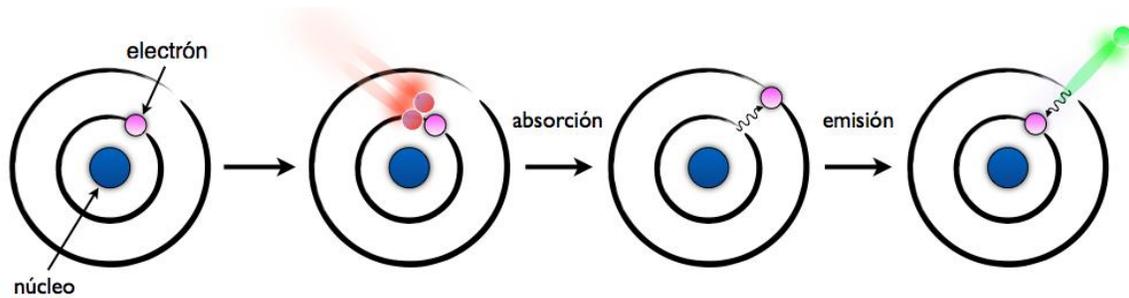


Figura 7. El efecto multifotónico. Un fluoróforo, como la FITC, también puede excitarse si su electrón absorbe dos fotones de baja energía (infrarrojos) en lugar de uno de alta energía (Fig. 1).

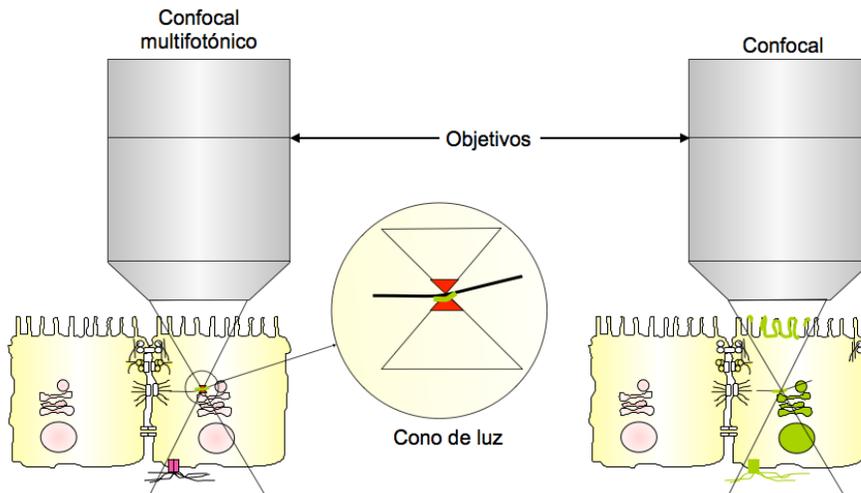


Figura 8. El microscopio multifotónico. Es un microscopio confocal convencional en el que la iluminación se hace con un láser pulsado. El impacto simultáneo del fluoróforo con dos (o más) fotones simultáneamente, excita al fluoróforo. El diafragma que restringe la luz desenfocada ya no es necesario, pues sólo se excita una pequeña parte del espécimen

(el cono de luz representado en rojo en el esquema de en medio. En el confocal el láser excita al espécimen en toda la vía de luz (estructuras dibujadas en verde), por lo que el apagamiento y la toxicidad son mayores que en el multifotónico.

Obtener una imagen en el microscopio se parece a pintar un cuadro con pinceles: el láser con el que se ilumina es como un pincel que, entre más delgado, permite pintar detalles más finos. La sección transversal del haz luminoso se observa, no como un círculo perfecto, sino como una mancha circular rodeada de anillos concéntricos sucesivos de intensidades variables que se conoce como la función de la dispersión del punto (Point Spread Function, PSF por sus siglas en inglés).

En la microscopía STED (Stimulated Emission Depletion Mycroscopy) [21], el espécimen se barre con un láser adelgazado más allá del límite de difracción, rodeándolo con otros infrarrojos muy intensos. En los bordes entre los láseres se “cancelan” los fotones, por lo que el láseres 10 veces más delgado. La  $R$  alcanza unos 50 nm y es suficiente para resolver una vesícula intracelular. Sin embargo, los fotones intensos apagan a los fluoróforos comunes por lo que hay que usar otros muy estables. Por otro lado, la resolución en el eje  $z$  es igual a del confocal.

Con la microscopía STORM (STocastic Optical Reconstruction Microscopy) y otras similares, se alcanza la resolución suficiente para resolver moléculas individuales en la célula [22]. Se obtienen miles de imágenes fluorescentes en periodos breves, se calcula la PSF de cada señal y se reconstruye una imagen con los puntos calculados a la máxima resolución [14]. Los microscopios STORM necesitan calibración muy precisa además de cómputo poderoso y prolongado.

Las microscopías nuevas han impactado enormemente en la investigación de la estructura y función celular, sin excluir la de los epitelios.

### **Epitelios, polaridad y adhesión**

Estos tejidos cubren las superficies corporales en los animales superiores, transportan vectorialmente sustancias entre los compartimentos que separan y generan, regulan y mantienen la composición de los fluidos que bañan dichos compartimentos. Forman la piel que cubre y protege a los animales, transportan los nutrientes hacia el interior y las sustancias de desecho a exterior del organismo y también secretan las lágrimas y las hormonas, son el primer punto de contacto de patógenos y sustancias tóxicas y en ellos se origina del 95 % de los cánceres.

Las células epiteliales se *unen entre sí* con complejos proteicos conocidos como uniones intercelulares, en especial **uniones ocluseras** (UOs), que sellan el espacio intercelular y evitan la difusión libre de sustancias entre los compartimentos separados [23]. Las células epiteliales están **polarizadas**, es decir, tienen su membrana plasmática dividida en una región apical orientada hacia el lumen del órgano, otra lateral, con la que se unen entre sí y una más basal, que contacta al substrato (Fig. 9) [24].

Las uniones intercelulares tienen una estructura semejante: se constituyen de moléculas de adhesión transmembranales cuyos dominios citosólicos se asocian a proteínas intracelulares que, a su vez, se unen al citoesqueleto. Las proteínas integrales de la unión oclusera (UO, también llamada zónula ocludens) son las claudinas y las intracelulares se denominan proteínas de la zónula ocludens-1, -2 y -3 (ZO-1,-2 y -3). Las claudinas sellan el espacio intercelular y ejecutan el transporte de sustancias a través del espacio entre las células [25] que, desde el punto de vista del transporte transepitelial, se le conoce como *ruta paracelular* [26]. Las proteínas integrales y citoplásmicas de las uniones adherentes (UA) son las cadherinas y las cateninas. Las cadherinas deben su nombre al hecho de que confieren adhesión dependiente de  $Ca^{2+}$  y, puesto que unen células idénticas, que expresan el mismo tipo de cadherina, se dice que la unión que establecen es "*homotípica*" [27]. Las proteínas citoplásmicas de las UO y UA se asocian al citoesqueleto de actina. Los desmosomas confieren resistencia mecánica a la unión intercelular y está constituidos de cadherinas desmosomales y proteínas intracelulares como las desmoplaquinas, que se asocian a los filamentos intermedios de citoqueratinas [28]. Por último, están las uniones comunicantes (UC) constituidas de las proteínas transmembranales llamadas conexasinas, que forman canales transmembranales para comunicar los citoplasmas de células vecinas [29]. Las uniones comunicantes permiten el paso de iones y moléculas pequeñas (<1000 Da) y coordinan la función de grupos celulares en la diferenciación y la respuesta inmune.

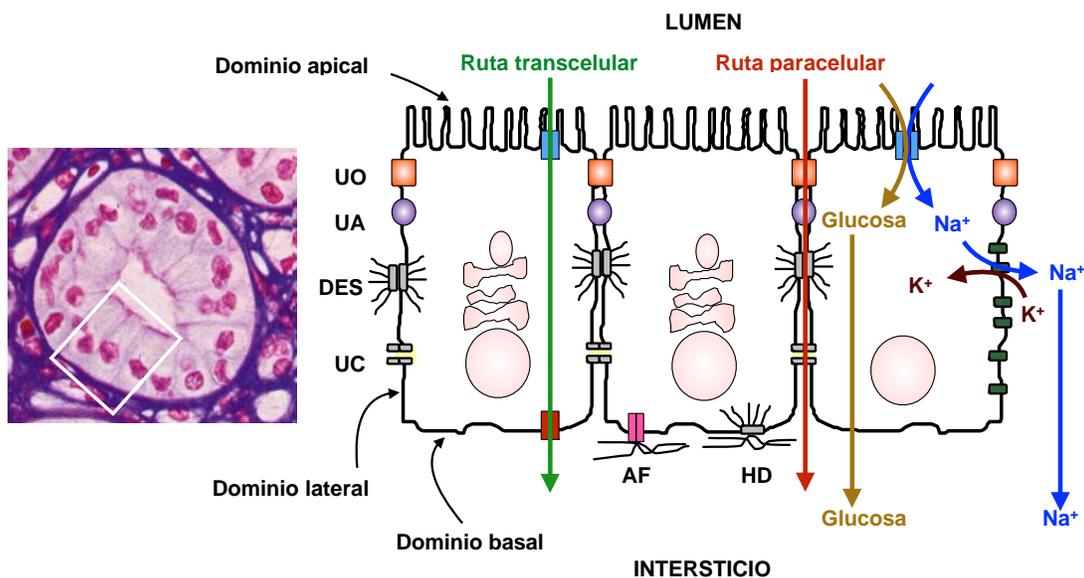


Figura 9. Estructura de los epitelios. Las células epiteliales se unen entre sí con uniones intercelulares oclusoras (UO), adherentes (UA), y comunicantes (UC), además de desmosomas (DES). Además, las células también se unen al substrato con hemidesmosomas (HD) y adhesiones focales (AF). Las células epiteliales están polarizadas, tienen su membrana plasmática dividida en un dominio apical, orientado hacia el lumen, otro lateral, con el que se contactan entre sí, y otro más basal, orientado hacia el intersticio. La expresión polarizada de acarreadores, canales y bombas (la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa se representa con los rectángulos verdes) es crucial para que los epitelios transporten vectorialmente.

La *polaridad* es una propiedad general de las células que les permite moverse en una dirección, generar una gema en un sitio específico, formar un contacto celular en determinado lugar, secretar y transportar sustancias en una dirección, percibir la dirección en la que se secretó una sustancia y/o formar contactos celulares, entre otras funciones. En el caso de los epitelios, la formación de uniones oclusoras y la expresión polarizada de canales, bombas y acarreadores, son cruciales para que puedan transportar vectorialmente sustancias a su través. La expresión polarizada de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, generalmente en la membrana lateral, es necesaria para que se lleve a cabo el transporte transepitelial. Esta enzima de la membrana plasmática de las células animales transporta dos iones  $\text{K}^+$  y un  $\text{H}^+$  hacia el interior, en intercambio con tres iones  $\text{Na}^+$  hacia el exterior celular, por cada molécula de ATP que degrada. De esta manera genera una diferencia entre las concentraciones intra- y extracelulares de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  que da origen a la diferencia de potencial eléctrico de la membrana plasmática e impulsa el transporte transmembranal de iones y moléculas pequeñas, como aminoácidos y azúcares (Fig. 9). El que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -

ATPasa se exprese sólo en la membrana lateral confiere al epitelio la capacidad de transporte vectorial transepitelial [30-32].

La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa se constituye de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  une al esteroide cardiotónico (EC) ouabaína (OUA), que inhibe la actividad de la enzima; la subunidad  $\beta$  es esencial para la actividad de ATPasa, funciona como una chaperona para que la  $\alpha$  arribe a la membrana apropiadamente y la  $\gamma$  es una subunidad reguladora de la actividad enzimática. Además de su función como proteína transportadora, la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es un receptor que transduce la información de que la ouabaína ha aumentado en el medio, como consecuencia de un alto consumo de sal o por una condición patológica como la hipertensión o el infarto al miocardio [33-35]. También la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es una molécula de adhesión intercelular, propiedad la que permite que se exprese exclusivamente en el dominio lateral, pues los dominios extracelulares de las subunidades  $\beta$  de células vecinas se unen entre si y restringen la difusión de la enzima en el plano de la membrana plasmática [34, 36-39].

#### **La $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es el receptor de la hormona ouabaína.**

Durante mucho tiempo se consideró a la OUA como una sustancia de origen vegetal que los animales adquieren de la dieta. Puesto que inhibe a la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa con alta afinidad y un inhibidor de este tipo podría ser un regulador muy conveniente de la enzima, se pensó que debería existir una sustancia análoga en animales. Hamlyn y colaboradores demostraron que existe ouabaína, idéntica a la vegetal, en el plasma de mamíferos, incluido el hombre, y que esta aumenta en la hipertensión [40]. En nuestro laboratorio demostramos que altas concentraciones de OUA ( $\geq 300$  nM) promueven que las células epiteliales de riñón de perro MDCK se despeguen entre sí y del sustrato [41]. Demostramos que, para inducir el despegue, la ouabaína activa las cinasas Src y ERK1/2, lo que induce la endocitosis de las proteínas de adhesión, incluidas las de la UO [42, 43]. La figura 10 muestra que la claudina-2, cultivada en condición control (figura 10, izquierda), se localiza en la UO, con un patrón que recuerda a un panal de abejas. Cuando se agrega ouabaína al medio, las células se despegan, fenómeno que podemos seguir midiendo la disminución de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET). El despegue es precedido por la endocitosis y degradación de las claudinas, en especial de la claudina-2 (Fig. 10, derecha).

Puesto que la OUA aumenta en la hipertensión, investigamos si esta condición patológica influye en la localización de las claudina-2 y -4. Los riñones de ratas normales expresan su claudina-2 en las UOs de los túbulos proximales y

de la -4 en los distales (Fig. 11, izquierda). Si las ratas se someten a una dieta alta en sal, desarrollan hipertensión y dejan de expresar a la claudina-2 mientras que aumenta la cantidad de claudina-4. La claudina-2 constituye un canal para el transporte paracelular de  $\text{Na}^+$  y agua mientras que la 4 impide el transporte de  $\text{Na}^+$ . Es posible que la disminución de ésta proteína del túbulo proximal, esté asociada a un mecanismo de compensación del organismo para eliminar la sal con la orina al impedir que se reabsorba quitando poros paracelulares para el  $\text{Na}^+$ .

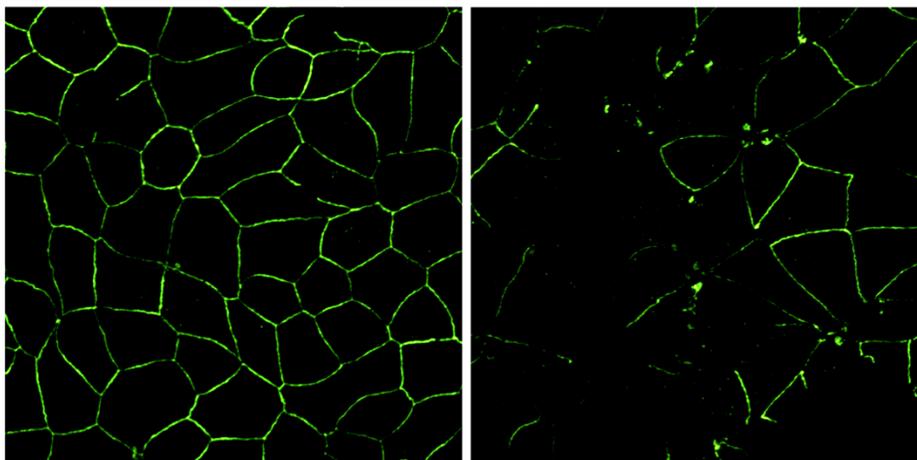


Figura 10. La ouabaína induce la endocitosis y degradación de la claudina-2. Se cultivaron células MDCK en condiciones control (Derecha) o con 300 nM de ouabína durante 9 h (izquierda). La claudina-2 se detectó por inmunofluorescencia (verde).

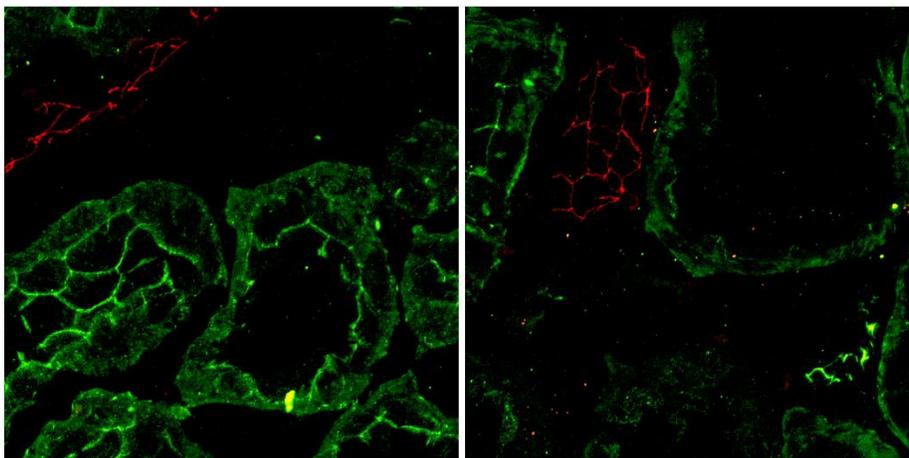


Figura 11. La claudina-2 deja de expresarse en los túbulos proximales de ratas hipertensas. Se sensibilizaron L-NAME durante 3 semanas, administrado en el agua de beber. Luego se las alimentó otras tres semanas con una dieta control (imagen de la izquierda) o con alta sal (4%, imagen de la derecha). Los riñones de ratas normotensas (izquierda) presentan la distribución típica de claudina-2 (verde) en las UOs de los túbulos

proximales y la claudina-4 (roja) en los túbulos distales. Los riñones de ratas hipertensas disminuyen la expresión de claudina-2 en la UOs, mientras que la claudina-4 aumenta.

La ouabaína ejerce efectos complejos en las UO que dependen de la concentración. A concentraciones altas (> 300 nM) despegas [42, 43], pero a concentraciones cercanas a las hormonales detectadas en plasma (10 nM), aumenta la adhesión según se detecta con la RET [44] y acelera el desarrollo del cilio mayor, estructura que percibe los cambios del ambiente y que constituye un evento tardío del desarrollo de la polaridad [45]. En todos estos casos la ouabaína ejerce su actividad activando la ruta Src-ERK1/2. También sabemos que no sólo la ouabaína es una hormona que regula a las UO, pues otro esteroide cardiotónico semi-sintético, el 21BD, disminuye la expresión de la claudina-2 de manera similar a la ouabína [46]. Los efectos de la ouabaína se acompañan de la translocación de la proteína de la UA  $\beta$ -catenina al núcleo, donde puede actuar como un factor de transcripción que promueva diferenciación [42].

### **Regulación de la hermeticidad de la OU**

Los epitelios regulan exquisitamente su permeabilidad paracelular de acuerdo con la función que desempeñan. En las regiones donde se necesita transportar sustancias y solutos en grandes cantidades, como en el yeyuno, los vasos capilares y túbulo contorneado proximal, los epitelios expresan uniones estrechas muy permeables. En los que se requiere transportar poco, resistir presiones altas o aislar componentes tóxicos, como el colon, la aorta y la vejiga urinaria, los epitelios expresan uniones estrechas herméticas. Las claudinas también se expresan en el tejido nervioso como es el caso de las células foliculo endoteliales de la hipófisis [47] y los oligodendrocitos. Sin embargo, el caso de la nefrona es paradigmático.

El riñón de los mamíferos filtra el volumen de plasma varias veces al día y elimina los metabolitos de desecho en la orina. El riñón adulto humano genera aproximadamente 170 litros de filtrado glomerular al día, el cual se modifica conforme viaja a lo largo de la nefrona y se reduce a tan solo 1-2 litros de orina. Entre las adaptaciones que permiten que esto ocurra se encuentran: un aumento progresivo de la complejidad estructural UO, una reducción del tamaño celular y de sus interdigitaciones entre células vecinas, un aumento progresivo en el grado de sellado de la unión estrecha y al cambios en la expresión de las claudinas (CLDNs). Las CLDNs que disminuyen la permeabilidad paracelular, como la CLDN-4, tienden a expresarse en los segmentos más herméticos, mientras que sucede lo contrario con aquellas que aumentan la permeabilidad [48]. Así, en el

túbulo proximal se expresa CLDN-2 y en el distal la CLDN-4, cambios que dependen de factores urinarios [49], en especial del factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) [50, 51].

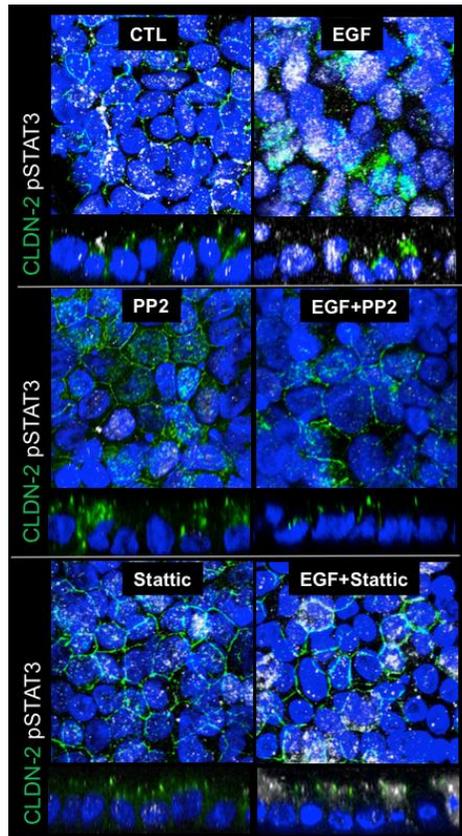


Figura 12: El EGF induce la migración de STAT3 al núcleo y esto depende de Src. Imágenes representativas de la localización de STAT3 (pSTAT3, blanco), CLDN-2 (verde) y núcleos (azul) de células MDCK tratadas por 15 h con y sin EGF (100 ng/ml), en inhibidor de la cinasa Src, PP2 (10  $\mu$ M) y el de la fosforilación de STAT3, Stattic (20  $\mu$ M).

El EGF aumenta la RET de células MDCK regulando negativamente a la CLDN-2 y positivamente a la CLDN-4. Los cambios en la RET involucran la activación de Src y de la translocación de la proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 3 (STAT3) [52]. Echando mano de la microscopía confocal, entre otras herramientas, nosotros demostramos que el EGF induce la activación de Src y que esto es necesario para la disminución de CLDN-2 en la UO, su endocitosis y posterior degradación en el lisosoma y la reducción del ARNm que codifica para su traducción, lo que finalmente resulta en un aumento de la RET. El EGF activa a Src y a STAT3 para frenar la transcripción y promover

la endocitosis y degradación de CLDN-2 (Fig. 12). El EGF aumenta la cantidad de STAT3 fosforilado en la Y705 en el núcleo. También demostramos que Src y STAT3 regulan el aumento de la transcripción, traducción y fusión exocítica de la CLDN-4 en la UO. Puesto que STAT-3 es una proteína que se metila, acetila y SUMOila, en la actualidad estudiamos si el EGF cambia alguna de estas propiedades para inhibir la transcripción e inducir la degradación de la CLDN-2. Así pues, el EGF regula los niveles de CLDN-2 y 4 y sus ARNm a través de la activación de Src y STAT3.

### Conclusiones

La microscopía confocal constituye una herramienta técnica indispensable para la investigación en muchos campos de la ciencia moderna, entre ellos el de la biología celular. Esta relación continuará en las décadas siguientes. Utilizando la microscopía confocal, nosotros hemos esclarecido problemas en la biología de los epitelios. Sabemos ahora que la ouabaína es una hormona que regula a las uniones intercelulares, en particular a las uniones ocluseras, a través de la activación de la ruta de señalización de Src-ERK1/2. También demostramos que el EGF urinario induce la diferenciación de las uniones ocluseras renales y que, activando a Src e induciendo la fosforilación y translocación de STAT3 al núcleo, regula negativamente a la CLDN-2 y positivamente a la -4. Sin embargo, los fenómenos importantes que explican estos cambios y la biología de las células en general, involucran complejos macromoleculares con un tamaño de apenas unos cientos de nanómetros, por lo que se necesitan nuevas microscopías, como las STED y STORM, para investigarlos. Es importante incorporar estas nuevas microscopías en el estudio de la biología de epitelios.

### Referencias

1. Davidson, M. W. (2013) Janssen's Microscope. <http://micro.magnet.fsu.edu/primermuseumjanssen.html>
2. van Leeuwenhoek, A. (1677). *R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.***12**, 821–831 [online] <http://rstl.royalsocietypublishing.org/content/12/133-142/821>.
3. van Leeuwenhoek, A. (1700). *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.***18**, 509–518
4. van Leeuwenhoek, A. (1702). *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 1–9
5. Hooke, R. (1665) *Micrographia by Robert Hooke*, London [online] <http://www.gutenberg.org/ebooks/15491>.
6. Abbe, E. (1874). *Proceedings of the Bristol Naturalists Society***1**, 200–261
7. Köhler, A. (1893) Gedanken zu einem neuen Beleuchtungsverfahren für mikrographische Zwecke. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie***364-367**

8. ZERNIKE, F. (1942) Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica***9**, 686–698
9. ZERNIKE, F. (1955). *Science***121**, 345–349
10. Lichtman, J. W., and Conchello, J.-A. (2005). *Nat Meth***2**, 910–919
11. Chalfie, M., Chalfie, M., Tu, Y., Tu, Y., Euskirchen, G., et al., (1994). *Science***263**, 802–805
12. Taylor, D. L., and Wang, Y. L. (1980). *Nature***284**, 405–410
13. Greenfield, E. A. (2013) *Antibodies*, Anchor Books
14. Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010). *J. Cell Biol.***190**, 165–175
15. Minsky, M., and Minsky, M. (1955) Microscope apparatus. G02B21/00 [online] <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio>
16. Einstein, A., and Einstein, A. (1916). *Deutsche Physikalische Gesellschaft, Verhandlungen***18**
17. Townes, C. H. (1964) Production of coherent radiation by atoms. *Nobel Lecture*, 1–29
18. Yam, P. (2004) *Everyday Einstein*, Scientific American
19. Zhang, J., Zhang, J., Campbell, R. E., Campbell, R. E., Ting, A. Y., Ting, A. Y., Tsien, R. Y., and Tsien, R. Y. (2002). **3**, 906–918
20. Tersoff, J., and Hamann, D. R. (1983). *Phys. Rev. Lett.***50**, 1998–2001
21. Hell, S. W., and Wichmann, J. (1994). *Opt Lett***19**, 780–782
22. Rust, M. J., Bates, M., and Zhuang, X. (2006). *Nat Meth***3**, 793–796
23. Cereijido, M., and Anderson, J. M. (2010) *Tight Junctions - Google Books*,
24. Cereijido, M., Contreras, R. G., and Shoshani, L. (2004). *Physiol. Rev.***84**, 1229–1262
25. Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). *J. Cell Biol.***141**, 1539–1550
26. Cereijido, M., Ruiz, O., Gonzalez-Mariscal, L., Contreras, R. G., Balda, M. S., García-Villegas, M. R., (1993). pp. 3–21, Springer US, Boston, MA
27. Hirano, S., Hirano, S., Takeichi, M., and Takeichi, M. (2012). *Physiol. Rev.*
28. Simpson, C. L. (2007). *J. Invest. Dermatol.***127**, 2499–2515
29. Oyamada, M., Oyamada, Y., and Takamatsu, T. (2005). *Biomembranes.***1719**, 6–23
30. KOEFOED-JOHNSEN, V., and USSING, H. H. (1958). *Acta Physiol. Scand.***42**, 298–308
31. Cereijido, M., Shoshani, L., and Contreras, R. G. (2001). *J. Membr. Biol.***184**, 299–304
32. Cereijido, M., Shoshani, L., Contreras, R. G., and Larre, I. (2005). *Physiological Mini-Reviews*
33. Liu, J., and Xie, Z.-J. (2010). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis*
34. Contreras, R. G., Flores-Benítez, D., Flores-Maldonado, C., Larre, I., Shoshani, L., and Cereijido, M. (2006). *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).***52**, 31–40
35. Shapiro, J. I. (2009). *Pharmacol Rev.***61**, 9–38

36. Cereijido, M., and Contreras, R. G. (1989). *Annual review of physiology*.
37. Shoshani, L., Contreras, R. G., Roldán, M. L., Moreno, J., Lazaro, A., Balda, M. S., Matter, K., and Cereijido, M. (2005). *Mol. Biol. Cell***16**, 1071–1081
38. Padilla-Benavides, T., Roldán, M. L., Larre, I., Flores-Benítez, D., Villegas-Sepulveda, N., Contreras, R. G., Cereijido, M., and Shoshani, L. (2010). *Mol. Biol. Cell***21**, 2217–2225
39. Cereijido, M., Contreras, R. G., and Shoshani, L. (2003) *Membrane targeting*, Progress in biophysics ...
40. Hamlyn, J. M., Blaustein, M. P., Bova, S., DuCharme, D. W., Harris, D. W., Mandel, F., Mathews, W. R., and Ludens, J. H. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***88**, 6259–6263
41. Contreras, R. G., Shoshani, L., Flores-Maldonado, C., Lazaro, A., and Cereijido, M. (1999). **112 (Pt 23)**, 4223–4232
42. Contreras, R. G., Flores-Maldonado, C., Lazaro, A., Shoshani, L., Flores-Benítez, D., Larre, I., and Cereijido, M. (2004). *J. Membr. Biol.***198**, 147–158
43. Rincon-Heredia, R., Flores-Benítez, D., Flores-Maldonado, C., Bonilla-Delgado, J., Garcia-Hernandez, V., Verdejo-Torres, O., et al., (2014). *Exp. Cell Res.***320**, 108–118
44. Larre, I., Lazaro, A., Contreras, R. G., Balda, M. S., Matter, K., Flores-Maldonado, C., et al., (2010). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***107**, 11387–11392
45. Ouabain modulates ciliogenesis in epithelial cells. (2011). *PNAS.* **108**, 20591–20596
46. Rocha, S. C., Pessoa, M. T. C., Neves, L. D. R., Alves, S. L. G., Silva, L. M., Santos, H. et al., (2014). *PLoS ONE* **9**, e108776
47. García-Godínez, A., Contreras, R. G., González-Del-Pliego, M., Aguirre-Benítez, E., Acuña-Macías, I., et al., (2014). *Cell Tissue Res.***357**, 309–321
48. Shoshani, L., Flores-Benítez, D., Gonzalez-Mariscal, L., and Contreras, R. G. (2006) in *Tight Junctions* pp. 146–163, Springer US, Boston, MA
49. Gallardo, J. M., Hernandez, J. M., Contreras, R. G., Flores-Maldonado, C., Gonzalez-Mariscal, L., and Cereijido, M. (2002). *J. Membr. Biol.***188**, 33–42
50. Flores-Benítez, D., Ruiz-Cabrera, A., Flores-Maldonado, C., Shoshani, L., Cereijido, M., and Contreras, R. G. (2007). **292**, F828–F836
51. Flores-Benítez, D., Rincon-Heredia, R., Razgado, L. F., Larre, I., Cereijido, M., and Contreras, R. G. (2009). *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **297**, C611–C620
52. Garcia-Hernandez, V., Flores-Maldonado, C., Rincon-Heredia, R., Verdejo-Torres, O., Bonilla-Delgado, J., Meneses-Morales, I., Gariglio, P., and Contreras, R. G. (2014). *J. Cell. Physiol.*, n/a–n/a

### **Semblanza del Dr. Rubén G. Contreras Patiño**



Investigador titular del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Originario de Jaral del Progreso Guanajuato. Biólogo egresado de la Universidad de Morelos. Maestro en ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la UNAM. Doctor en Ciencias (Fisiología, 1991) del Departamento de Fisiología,

Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV). Investigador del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados desde 1987.

Está interesado en investigar la biología de los epitelios, en especial los mecanismos de adhesión y distribución asimétrica de las células epiteliales. Ha demostrado que el calcio, la hormona ouabaína y el factor de crecimiento epidermal regulan la adhesión, la estructura y función de la unión estrecha y polaridad epitelial. Ha publicado 54 trabajos internacionales sobre el tema en revistas de alto impacto, por los que ha recibido más de 1660 citas en publicaciones internacionales. Ha graduado 17 alumnos de postgrado. Recibió el Premio Weizman a la mejor tesis de doctorado 1993, otorgado por la Academia de la Investigación Científica, y el Institute for Scientific Information lo distinguió como autor de dos de los trabajos latinoamericanos más citados (Am. J. Physiol. 259:C978-C986, 1990; J. Membrane Biol. 122:193-202. 1991). *Mente Quo Salud* 2012. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde 1988 e Investigador Nacional II desde 1997.



Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 41-58, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## “ENZIMAS, MÁS ALLÁ DEL INICIO DE LA REACCIÓN”

### “Enzymes, beyond the initial reaction region”

López-Munguía Canales Agustín y Porras Domínguez Jaime Ricardo.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa. Cuernavaca 62240, Morelos, México. Tel. 553291609.

[agustin@ibt.unam.mx](mailto:agustin@ibt.unam.mx)  
[jrpd@ibt.unam.mx](mailto:jrpd@ibt.unam.mx)

## RESUMEN

En la caracterización cinética de las enzimas desde un enfoque meramente bioquímico, es usual –al menos como una primera aproximación- determinar si éstas obedecen el mecanismo de Michaelis Menten y determinar los parámetros cinéticos que las caracterizan. Nos referimos específicamente a las constantes cinéticas  $K_m$  y  $k_{cat}$  asociadas a dicho modelo, y usadas comúnmente como una referencia a la afinidad de la enzima por el sustrato de la reacción ( $K_m$ ) y al número de recambio ( $k_{cat}$  o el número de moléculas de sustrato que una molécula de enzima puede transformar por unidad de tiempo) respectivamente, y combinando ambas, a la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ). Como tales, estos parámetros son de gran utilidad en la caracterización y comparación del comportamiento de las enzimas, pero no suficientes para el diseño de una reacción enzimática completa. El procedimiento de caracterización bioquímica sigue siendo válido, a pesar de que el modelo de Michaelis Menten fue publicado

hace 102 años; sin embargo, cada vez hay mayor influencia de las enzimas en reacciones cotidianas fuera de la célula -tanto en la industria como en el laboratorio- invita al bioquímico a analizar lo que sucede a lo largo de toda la reacción. En este escrito revisamos el significado de estos parámetros y la forma de obtenerlos, haciendo énfasis en las limitaciones que impiden su aplicación más allá del inicio de la reacción. Revisaremos estrategias y herramientas para estudiar las reacciones en las que se requiere llegar a la máxima conversión de sustrato. En efecto, es alejarnos de ésta usual caracterización bioquímica que el comportamiento de las enzimas empieza a verse afectado por la desactivación misma de la enzima, la reversibilidad de la reacción o el efecto de los productos sobre la enzima en la propia reacción, entre otros efectos inexistentes o ignorados en los estudios realizados durante la etapa inicial.

**Palabras clave:** Enzima, comportamiento cinético, velocidades iniciales.

### ABSTRACT

The classical biochemical characterization of enzymes following Michaelis-Menten kinetics, requires the definition of the so called kinetic parameters, usually referred to as  $K_m$  and  $k_{cat}$ , which are also important reference to the affinity of the enzyme for the substrate and to the enzyme turnover number (the number of substrate molecules transformed by the enzyme per time unit) respectively, as well as the catalytic efficiency derived from the ratio  $k_{cat}/K_m$ . These parameters are useful in the characterization and comparison of the enzyme behavior, but not enough for a proper characterization and design of an entire enzymatic reaction. It is important to point out that the biochemical characterization is still valid, in spite of the fact that the Michaelis-Menten model was published 102 years ago; however the growing interest of enzyme reactions outside the cell, both in the biocatalysis industry as well as in the laboratory- require a deep understanding of the reaction evolution. In this article we review the importance and meaning of the classical kinetic parameters with particular interest in the limitations involved in the description of the reaction beyond the initial rate zone. Some of the strategies and tools to study enzymatic reactions that reach high substrate conversion will be reviewed. In this context, when reactions are studied far away from the initial rate region, enzyme behavior may be affected by denaturation, reversibility/equilibrium or by the effect of reaction products, among other effects either inexistent or ignored during initial rate experiments.

**Keywords:** Enzyme, kinetic behavior, initial rates.

## INTRODUCCIÓN

De la misma forma que existe un registro histórico de las primeras aplicaciones de microorganismos en las civilizaciones antiguas, por ejemplo la descripción de la elaboración del vino en el Código de Hammurabi en la antigua Babilonia (2100 a.C.), existe una serie de aplicaciones tradicionales empíricas de las enzimas, como la coagulación de leche con pieles de estómagos de ternera o el ablandamiento de carnes con hojas de papaya [1]. Después de varios siglos René Antoine Réaumur, relacionó los cambios asociados en este tipo de fenómeno a la misma materia viva, estudiando la digestión de la carne en el interior de estómagos de animales, y describiéndolo como un proceso enteramente químico asociado a los seres vivos [1].

Varios científicos continuaron este tipo de estudio a través del cual se llegó a relacionar las transformaciones de la materia orgánica de algunos procesos con un cierto tipo de sustancias presentes en las propias células. Wilhem Kühne, científico alemán, estudiando reacciones químicas con extractos de levadura, y bautizó a los agentes responsables de estos cambios con el nombre de enzimas, derivado de la palabra griega *en* que significa “en el interior” y *zyme* “levadura o fermento”. [2]

Uno de los primeros retos en el avance del conocimiento de aquellas sustancias capaces de transformar la materia, ahora llamadas *enzimas*, fue describir su funcionamiento. Emil Fisher a finales del siglo XIX propuso el modelo de llave-cerradura para explicar la especificidad de las enzimas, modelo que hasta la fecha permite una primera visualización de lo que sucede al encontrarse una enzima con su sustrato y nos da una idea del concepto de especificidad. [1] La demostración de la formación del complejo enzima sustrato (ES) fue el elemento central del desarrollo de modelos matemáticos para comprender el funcionamiento de las enzimas. Victor Henri en 1903 publicó el primer modelo matemático, pero con una serie de deficiencias experimentales que permitieron que más tarde Leonor Michaelis y Leonora Menten corrigieran y concluyeran la propuesta de Henri dando lugar a la famosa ecuación que lleva su nombre. En realidad la ecuación debería ser conocida como de Briggs-Haldane (por G.E.Briggs y J.B.Haldane), pues fueron ellos quienes dieron forma y sustento a la ecuación que hoy conocemos como de Michaelis-Menten (M&M) [3].

Es la ecuación o modelo de M&M el que ha servido a la bioquímica para caracterizar las propiedades esenciales de las enzimas, y algunos de los diseños

de aplicaciones de gran impacto en la industria química, la alimentaria, la farmacéutica y la analítica, entre otras. Sin embargo, para muchas enzimas el modelo de M&M no se ajusta a la realidad, entre otras causas por factores que si bien no afectan las velocidades iniciales de la reacción se vuelven trascendentes cuando la reacción se aleja de esta zona. Se invita al lector a revisar los elementos esenciales involucrados en la definición de este modelo, ampliamente descritos en los textos de bioquímica clásica.

### **Las enzimas en velocidad inicial**

Por diversas causas que a continuación se describen, la velocidad de reacción, definida como la cantidad de producto que la enzima origina en un determinado tiempo, por lo general se mide sólo durante los primeros instantes de la reacción, obvia razón por la cual las definimos como velocidades iniciales [4]. Así, la caracterización cinética de una reacción enzimática, una vez definida la temperatura (T), el pH y una concentración adecuada de enzima ( $E_T$ ) a las que se estudiará su comportamiento, requerirá de la medición de un número suficiente de velocidades iniciales a otras tantas concentraciones de sustrato. El producto obtenido durante los primeros instantes de cada uno de los experimentos realizado a diferentes concentraciones de sustrato, entre el tiempo, nos dará la velocidad inicial a la concentración inicial de sustrato empleada en el experimento (Fig. 1A). Finalmente, observar cómo varía la velocidad inicial de reacción con respecto a la concentración del sustrato (Fig. 1B), permite definir el “orden de la reacción” (Fig. 2).

La velocidad de una reacción es modificada en función de la concentración de sustrato de acuerdo con el orden de la misma. En el caso particular de las reacciones enzimáticas descritas por el modelo de M&M el orden de la reacción depende de la zona de concentración en las que la reacción se lleva a cabo. Así, hay dos regiones extremas que describen el comportamiento cinético Michaeliano. La primera, cuando la concentración de sustrato es muy alta, zona en la que la enzima se encuentra saturada (conviene recordar que la enzima está saturada cuando en la reacción hay un exceso de sustrato con respecto a la enzima). Es entonces que la reacción se comporta como de orden “cero”, es decir que las reacciones proceden a una misma velocidad, independientemente de la concentración de reactivo o sustrato que se tenga: este es un mecanismo del que se vale la célula para que las enzimas no rebasen una determinada velocidad, independientemente de todo el sustrato que se acumule. La otra región extrema es aquella en la que la concentración de sustrato es pequeña, zona en la que la relación entre velocidad y concentración es lineal, es decir a un aumento o

disminución de la concentración de sustrato, corresponde otro directamente proporcional de la velocidad; este comportamiento es característico de las reacciones cuyo orden es de uno (Fig. 2) [4].

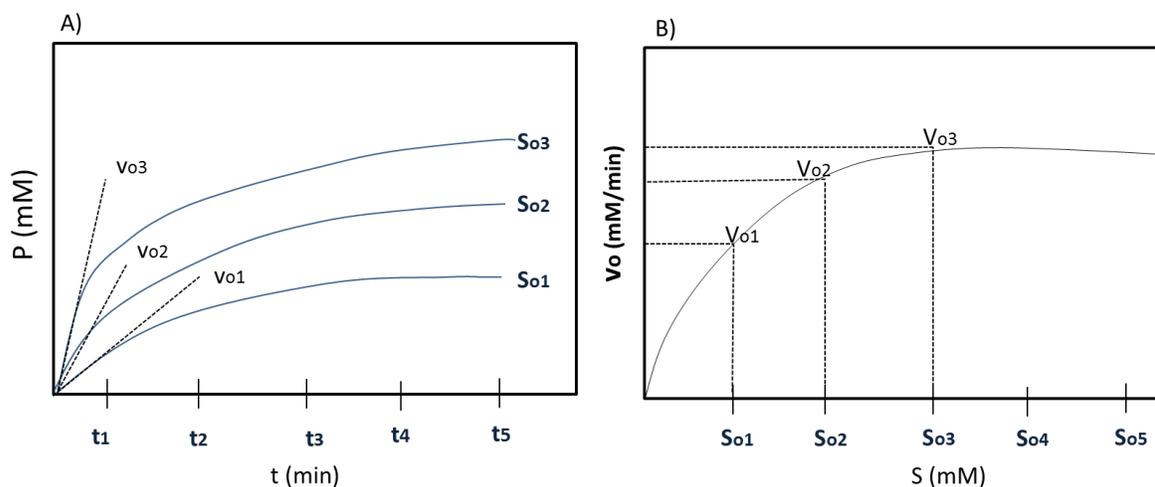


Figura 1. A) Linealidad en una reacción enzimática, en la medición de velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato. B) Comportamiento michaeliano de la velocidad de una reacción en función de la concentración de sustrato

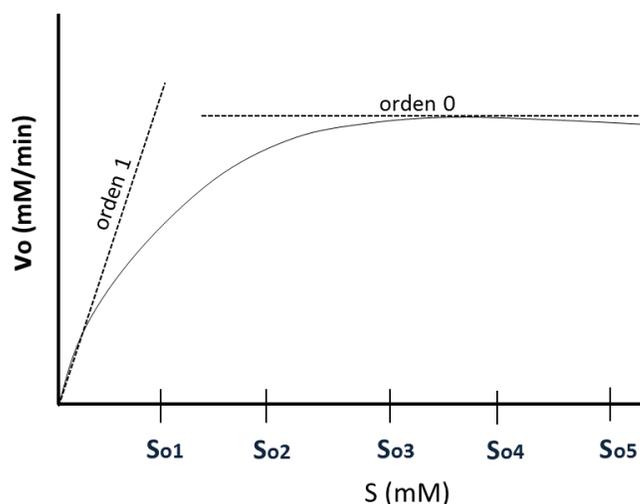


Figura 2. Ejemplo de cinética Michaeliana en donde se muestra los dos órdenes de reacción.

Como cualquier estudiante de bioquímica sabe, la ecuación de Michaelis-Menten se deriva de un mecanismo para la reacción que supone la formación reversible del complejo enzima-sustrato (ES), con constantes de velocidad de reacción características  $k_1$  y  $k_{-1}$ , y la transformación irreversible de este último en producto (P) regenerando la enzima, de acuerdo con una constante de primer orden definida como  $k_2$ , equivalente a la  $k_{cat}$  cuando es referida a la concentración molar de enzima. Dentro de esta ecuación existen dos parámetros universales que nos ayudan a caracterizar y comparar enzimas. Nos referimos a la  $K_m$  constante de Michaelis-Menten, relacionada con las constantes de velocidad antes mencionadas ( $K_m = k_{-1} + k_2 / k_1$ ) y la  $V_{max}$ , la velocidad máxima que puede alcanzar una reacción enzimática a una concentración dada de enzima, de tal suerte que  $V_{max} = k_2 E_T$  o  $V_{max} = k_{cat} E_T$

Una de las razones por las cuales debemos asegurarnos de que sea bien la velocidad inicial la que medimos experimentalmente, es debido a que iniciamos el experimento a una concentración conocida de sustrato, definida por nosotros mismos para ese experimento (Fig. 1). Así, consideraremos que la velocidad inicial medida ( $v_0$ ), corresponderá a la concentración de sustrato que colocamos en nuestro ensayo ( $S_0$ ). Más allá de esta zona, el cambio de la concentración de sustrato se vuelve significativo, por lo que -recordando que la velocidad de la reacción es dependiente de la concentración- nos encontraremos en una zona de la reacción en la que la velocidad que estamos midiendo corresponde a una concentración de sustrato menor y por lo tanto, puede haber empezado a disminuir. En otras palabras, si analizamos a lo largo del tiempo una reacción hasta su conclusión, recorreremos todo el espectro de concentraciones de sustrato, y la reacción disminuirá desde su valor inicial hasta cero, una vez que la reacción haya concluido. Esta situación se ilustra en la Fig. 3. donde se especifica que la velocidad corresponde a la pendiente de la curva de concentración de producto o sustrato (en este caso negativa por referirse al sustrato que desaparece) en función del tiempo.

Si nuestro laboratorio está magníficamente equipado, y el sistema de reacción nos permite llevar a cabo un estudio cinético como el ejemplificado en la Fig. 3, en el que se puede monitorear de forma continua la caída de sustrato, ¿por qué no obtener de ahí un infinito número de pendientes (velocidades de reacción) y graficarlas contra la concentración de sustrato a la que se obtuvo esa pendiente? (Es importante señalar que las pendientes deben medirse en intervalos de tiempo muy cortos para que podamos considerar una concentración de sustrato promedio en el intervalo que no afecte la medición de velocidad). Las razones son múltiples,

siendo la más importante el que de esta manera, se incluye la presencia del producto que se acumula en la reacción, efecto que no se presenta en los estudios en velocidad inicial. Una segunda causa estaría relacionada con la posibilidad de tener reversibilidad en la reacción: más allá de la velocidad inicial, la obtención de sustrato a partir del producto invalida esta metodología. En velocidad inicial, el equilibrio está muy lejos, e incluso es posible estudiar la reacción reversible de forma independiente, incluso también suponiéndola irreversible. Una razón adicional tiene que ver con la estabilidad de la enzima, de la que por lo general nos preocupamos poco en estudios de reacciones de unos cuantos segundos o minutos, pero que pueden perder actividad a tiempos largos de reacción. Sin embargo, estas mismas razones serán las que nos obliguen a profundizar en el comportamiento cinético de una enzima, particularmente cuando queramos describir lo que pasa en una reacción que queramos llevar a feliz término.

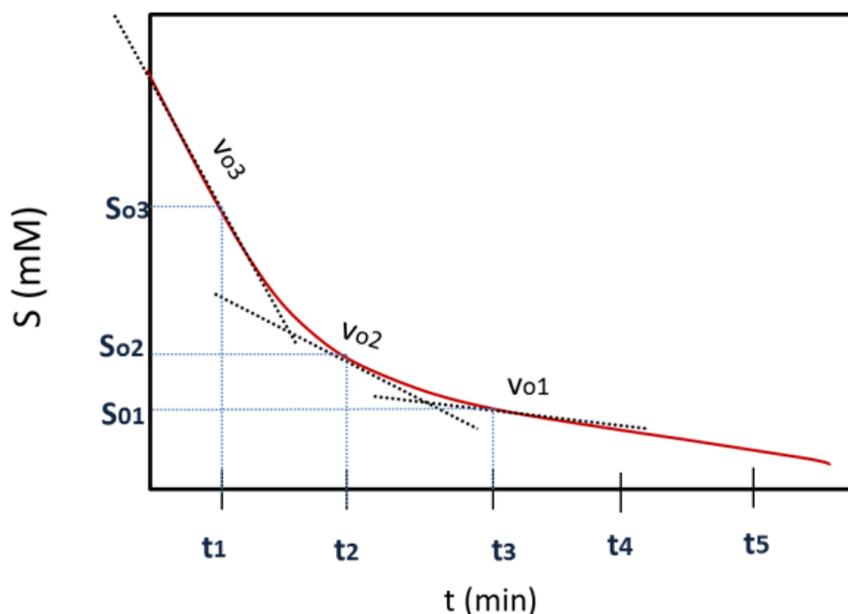


Figura 3. Comportamiento cinético de una reacción enzimática a lo largo del tiempo.

### Un reactor intermitente

Un tubo de ensayo, un matraz, o una celda de espectrofotómetro, se convierten en un reactor enzimático en el momento en el que agregamos un sustrato y una enzima para que sea transformado a producto. En cinética de reactores, se acostumbra hacer balances de materia para describir este proceso, considerando la entrada y salida de materia, así como su acumulación. Sin embargo en el caso de los tubos de ensayo la situación es muy simple, ya que una vez iniciada la reacción, no hay materia que entre, ni materia que salga, por lo que sólo tendremos acumulación de producto ( $dP/dt$ ) o bien desaparición de sustrato ( $-dS/dt$ ). Estos cambios dependerán de la velocidad de reacción ( $-dS/dt = v$ ), en nuestro caso descrita por el modelo de Michaelis Menten [ $-dS/dt = V_{\max} S / (K_m + S)$ ].

En consecuencia, si integráramos la ecuación de M&M tendremos una ecuación que describe el comportamiento de la reacción a lo largo de todo el tiempo de la reacción (Ec. 1), Con la misma ecuación podríamos calcular las constantes cinéticas realizando un sólo experimento iniciado a una alta concentración de sustrato, y no como ya hemos descrito, determinando las velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato, cosa que nos recomendaría por ejemplo, un vendedor de espectrofotómetros.

$$k_2 E_t t = (S_0 - S) - K_m \ln S/S_0 \quad (\text{Ec. 1})$$

$K_m$  = Constante en Michaelis-Menten  
 $S_0$  = Concentración inicial de sustrato.  
 $S$  = concentración de sustrato a un tiempo  $t$ .  
 $t$  = tiempo.

Una de las formas de determinar las constantes cinéticas a partir de esta ecuación es emplear métodos numéricos un poco más complejos a los empleados en las regresiones lineales a las que solemos recurrir cuando determinamos los parámetros empleando la ecuación de M&M de forma lineal (Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk entre otros). De hecho el empleo de regresiones lineales es rechazado ya por la mayor parte de las revistas científicas, debido a dos causas: la primera es que al hacer la ecuación de M&M linear tomando el inverso de la ecuación (método de Lineweaver-Burk), se incrementa el error experimental en el que incurrimos en la medición de la velocidad [5]. El segundo es que no hay necesidad de recurrir más a los métodos gráficos o la regresión linear, debido al

desarrollo de herramientas computacionales y algoritmos que nos permiten obtener estos parámetros mediante regresiones no lineales [6], al alcance de cualquier computadora personal o teléfono inteligente.

### Más allá de la velocidad inicial

Como señalamos, uno de las desviaciones más frecuentes al comportamiento Michaeliano de las enzimas al alejarse de las condiciones iniciales de reacción se debe a la presencia de él o los productos. En efecto, el producto puede presentar algún tipo de inhibición, por ejemplo competitiva, caso en el cual se une a la enzima en el sitio catalítico, impidiendo la unión con el sustrato y por ende, la catálisis de la reacción (Fig. 4A) [2]. Un segundo caso sería el de una reacción reversible, en la que, lejos de la velocidad inicial, el sustrato es transformado a producto y éste a su vez en sustrato, hasta alcanzar el equilibrio cuando ambas velocidades sean iguales (Fig. 4B). En las figuras se muestra la modificación a la ecuación de M&M para estos dos casos.

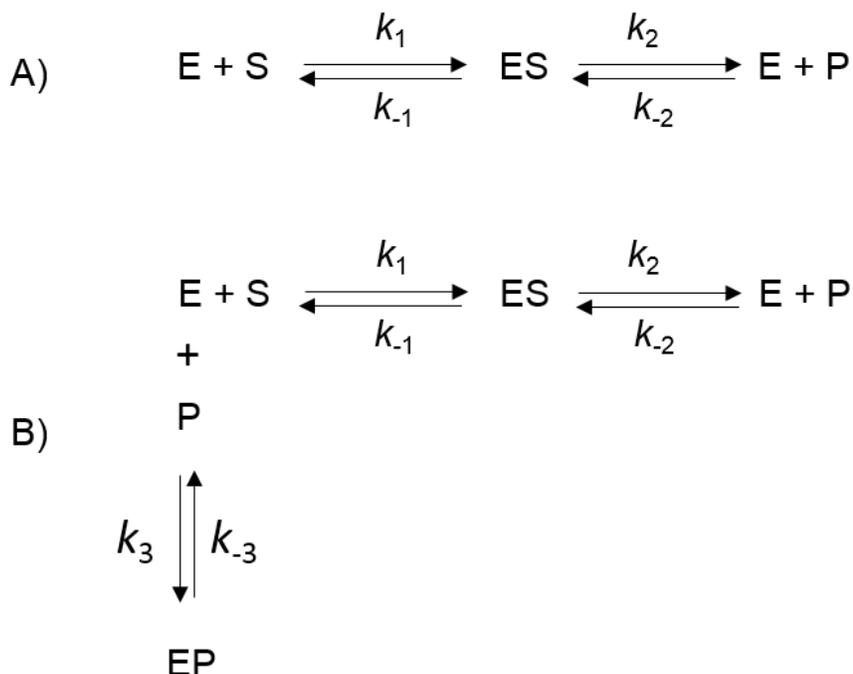


Figura 4. A) Modelo cinético de una reacción reversible b) Modelo cinético de inhibición competitiva por producto.

$$V_0 = \frac{V_{\max} S}{S + K_m \left(1 + \frac{P}{K_p}\right)} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:  $K_p = k_{-3} / k_3$

$$V = \frac{V_{\max} f \frac{[S]}{K_s} - V_{\max} r \frac{[P]}{K_p}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[P]}{K_p}} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde: los parámetros cinéticos de la reacción de ida son  $K_s$  y  $V_{\max}f$  y los de regreso  $K_p$  y  $V_{\max}r$ . Además:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad K_p = \frac{k_{-2}}{k_2}$$

Si un intolerante (a la lactosa) desea deslactosarla (hidrolizar la lactosa) con una enzima  $\beta$ -galactosidasa que adquirió en Sigma y que tiene una  $k_{\text{cat}}$  de  $2325 \text{ s}^{-1}$  y una  $K_m$  de 10 mM, cometiendo el absurdo desperdicio de usar la enzima pura, podrá sin embargo usar la ecuación 1 para saber que concentración de enzima ( $E_T$ ) tiene que agregar a un litro de leche para que en 2 horas logre deslactosar el 80% de los 50 g/L de lactosa que tiene la leche de vaca. Pero si como es el caso, resulta que la galactosa es un inhibidor competitivo de la reacción, entonces su cálculo de la concentración estará subestimado. Para esto se tiene que recurrir a la ecuación 4, que describe el cambio de la velocidad considerando la aparición paulatina del producto. Conforme a lo antes expuesto, para describir el desarrollo de la reacción, la ecuación debe integrarse, cosa que empieza a complicarse. Conforme el modelo se hace más complejo, la integración directa puede llegar a ser imposible, lo que obliga a recurrir a los ya mencionados métodos numéricos de integración como el de Runge-Kutta o el de Euler, que son empleados en algunos

softwares de integración numérica como Matlab™ o Bekerley Madonna™ para la resolución de estos modelos.

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{Et k_{cat} S_1}{S_1 + K_m \left(1 + \frac{(S_0 - S_1)}{K_p}\right)} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

$S_0$  =Concentración de sustrato inicial

$S_1$  = concentración de sustrato a un tiempo  $t_1$

Resolviendo la ecuación 4 ya sea vía su integración directa o mediante métodos numéricos, podremos calcular de forma más precisa la concentración de en enzima requerida, considerando que es inhibida por su producto.

Otra reacción importante desde el punto de vista industrial que ejemplifica las complejidades que se presentan al modelo convencional de M&M, es la hidrólisis de la penicilina catalizada por la enzima penicilin acilasa. Esta enzima, que puede perfectamente caracterizarse con el modelo de M&M, es inhibida por el exceso del sustrato penicilina, preferidas por la industria, pero inusual en las células. La enzima es inhibida también por sus dos productos: el ácido fenilacético y el ácido aminopenicilánico (Fig. 5). Cuando se caracteriza esta enzima por los métodos convencionales no se observan los efectos de inhibición que solo estarán presentes en el transcurso de la misma. En lugar de la compleja tarea de integrar directamente la ecuación 5, es posible llevar a cabo su integración numérica y simular diferentes condiciones de reacción. Previamente deberán realizarse experimentos para determinar las constantes del modelo.

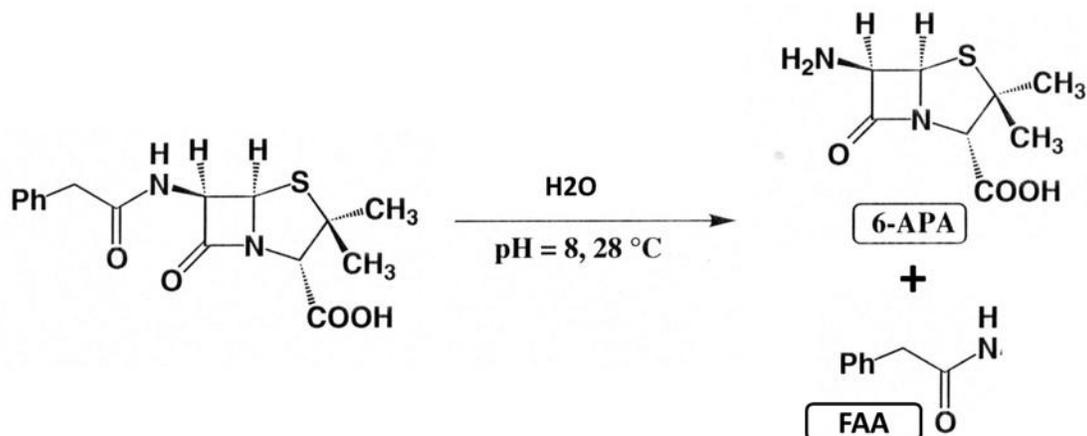


Figura 5. Reacción de la hidrólisis de la penicilina catalizada por la penicilin acilasa correspondiente a la ecuación de la velocidad de consumo de la penicilina (Ec 5), [7].

$$-\frac{dS}{dt} = k_2 ES \frac{k_2 ES}{K_m \left[ 1 + \frac{P_1}{K_{faa}} + \frac{P_2}{K_{apa}} + \frac{P_1 P_2}{K_{faa} K_{apa}} \right] + S \left[ 1 + \frac{P_2}{K_{apa}} + \frac{S}{K_s} \right]} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

$k_2$  y  $K_m$  los parámetros clásicos de Michaelis-Menten,

$P_1$  es la concentración competitiva de fenil acético.

$P_2$  es la concentración no competitiva de 6-amino penicilánico.

$K_{faa}$  y  $K_{apa}$  las respectivas constantes de inhibición.

$K_s$  la constante de inhibición por exceso de sustrato,

Volviendo al ejemplo de la  $\beta$ -galactosidasa para introducir otra variante al modelo cinético, ahora sabemos que la enzima también se puede comportar como transferasa y sintetizar un trisacárido, al transferir galactosa a la molécula de sacarosa. Si agregamos esta última reacción al esquema del mecanismo de M&M, observamos que la lactosa da lugar al complejo covalente galactosil-enzima (EGa) que puede ya sea dar lugar a la reacción reversible o bien puede transferir la molécula de galactosa a una molécula de lactosa (Fig. 6) [8].

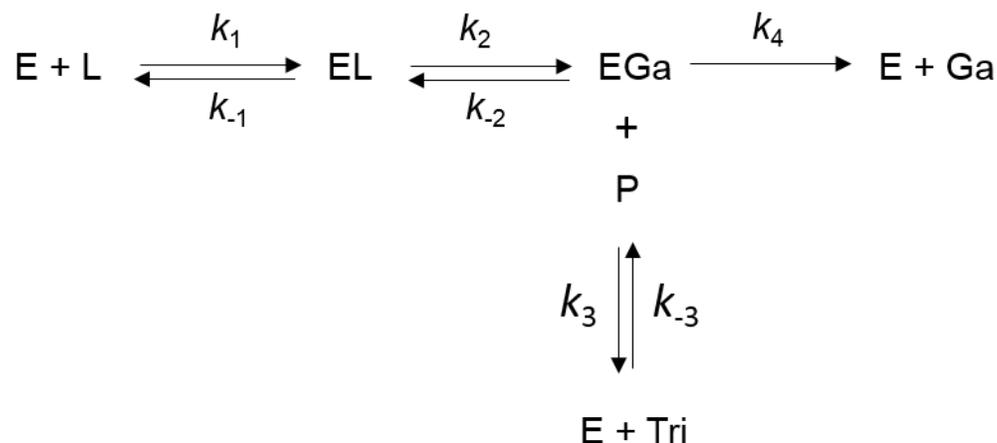


Figura 6. Modelo cinético de la  $\beta$ -galactosidasa. E-enzima L-lactosa, Ga-galactosa y Tri el trisacárido sintetizado. Y ecuación diferencial del consumo de la lactosa. [9]

$$-\frac{dL}{dt} = k_1 [L] [E] - k_{-1} [EL] + k_3 [L] [EGa] - k_{-3} [E] [Tri] \quad (\text{Ec. 6})$$

Como puede observarse con esta ligera variante el modelo se complica aún más. La ecuación 6 muestra la velocidad de consumo de la lactosa, que ahora no solo depende de la reacción de hidrólisis sino también de la de transferencia. Para poder describir un modelo cinético como éste, es necesario determinar los valores de las constantes. Con la ayuda de un número bastante amplio de experimentos y simulaciones en la resolución de las ecuaciones diferenciales de cada una de las especies que intervienen en el modelo cinético. Una vez llevada a cabo esta ardua tarea podremos predecir con mayor exactitud el tiempo en el que nuestra leche está libre de lactosa.

Existe otro ejemplo interesante para ilustrar las desviaciones del comportamiento cinético más allá de la velocidad inicial cuando la enzima es suficientemente estable durante el tiempo en que se hace el ensayo de la velocidad inicial, pero no para mantener la actividad constante durante toda la reacción, una suposición implícita en el modelo de M&M. En estos casos conforme transcurre la reacción la enzima se inactiva a una tasa dada repercutiendo en las mediciones de velocidad. En este caso habría que incorporar al modelo de M&M un modelo cinético de inactivación de la enzima. En la figura 8 se incorporó al

modelo de M&M un modelo de inactivación de la enzima de primer orden, cuya constante de desactivación puede ser evaluada en función de la temperatura mediante la ecuación de Arrhenius [10]. Como se observa en la ecuación 7, el parámetro modificado en la ecuación de M&M es la velocidad máxima; que es función de la concentración de enzima. Dado que  $E_t$  disminuye con el tiempo de reacción y la temperatura, es necesario sustituirla por la predicción que hace el modelo de desactivación de primer orden, y de ser necesario, por la temperatura de acuerdo con Arrhenius (Ec. 8).



$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [Et] e^{-k_{\text{inact}}} \quad (\text{Ec. 7})$$

$$k_{\text{inact}} = \frac{k_B T}{h} e^{\left[ \frac{-\Delta G_{\text{inact}}}{RT} \right]} \quad (\text{Ec. 8})$$

En la Tabla I se presentan otros ejemplos interesantes que el estudiante puede utilizar para una comprensión general del tema.

Tabla I. Ecuaciones que representan la velocidad de desaparición de sustratos en reacciones enzimáticas con diferentes desviaciones al modelo de M&M [9].

$-\frac{dS}{dt} = \frac{k_2 E \left( S - \frac{P}{k_{eq}} \right)}{K_m f + S + \frac{K_m f P}{K_m r}}$	Reacción reversible (glucosa isomerasa)
$-\frac{dS}{dt} = \frac{K_2 ES}{K_m + S + \frac{S_2}{k_i}}$	Reacciones con inhibición por exceso de sustrato  (invertasa)
$-\frac{dS}{dt} = \frac{K_2 ES}{K_m \left[ 1 + \frac{P_1}{K_{i_1}} + \frac{P_2}{K_{i_2}} \right] + S \left[ 1 + \frac{P_2}{K_{i_2}} \right]}$	Reacciones con inhibición por dos productos (lactasa)
$-\frac{dS}{dt} = \frac{k_2 ES_1 S_2}{K_{m_1} K_{m_2} + K_{m_1} S_1 + K_{m_2} S_1 + S_1 S_2}$	Reacciones con do sustratos (Glucosa oxidasa)

## Conclusiones

La determinación de velocidades iniciales en la caracterización cinética de enzimas a través de los parámetros clásicos es suficiente desde el punto de vista bioquímico, pero con frecuencia inadecuado si se pretende describir el curso de la reacción. Esto es debido a diversas formas en las que las reacciones se desvían de la idealidad que involucra el comportamiento Michaeliano. Las desviaciones analizadas en esta revisión consistieron en la inhibición por sustrato, la inhibición por producto, la reversibilidad de la reacción y la inestabilidad de la enzima durante la reacción. La definición de modelos adecuados que describan el comportamiento de la enzima más allá de la velocidad inicial de reacción es fundamental cuando se hacen recomendaciones sobre la forma de aplicar determinadas enzimas en el laboratorio o en el uso de productos enzimáticos comerciales, y resulta esencial en el diseño de reactores enzimáticos en procesos industriales.

### Referencias

1. Copeland R. A brief history of enzymology. (2000). Wiley-VHC Inc. 9p.
2. Segel I. Enzyme Kinetics. Wiley-Interscience. USA. 1993. 957p.
3. Johnson K a., Goody. (2011). *Biochemistry*. 2011 8264-8269.
4. Albert L. Lehninger; David L. Nelson; Michael M. Cox. Lehninger: principios de bioquímica. Ediciones Omega, Cataluña España. 2009. 1296 p.
5. Dowd JE, Riggs DS. (1965). A comparisson of estimates of Michaelis-Menten kinetics constants from various linear transformations. *J Biol Chem*. 863-869.
6. Hernández a, Ruiz MT. (1998) An EXCEL template for calculation of enzyme kinetic parameters by non-linear regression. *Bioinformatics*. 227-228.
7. Ospina s., López-Munguía A., González R.L. and Quintero R. (1992). J.Chem. Tech. Biotechnologia 53p.
8. Yang S. and Okos M. (1989). *Biotechnol.Bioeng* 33, 873-885pp.
9. Moreira R., Wallace K. Computer and Information Science Applications in Bioprocess Engineering. Baltimore USA. 1996. 179-189p.
10. Eisenthal R, Peterson ME, Daniel RM, Danson MJ. (2006). *Biotechnology. Trends Biotechnol*. 289-292.

## Semblanza del Dr. Agustín López-Munguía Canales



Investigador Titular C de tiempo completo del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca Morelos.

Es Ingeniero Químico por la UNAM con Doctorado en Biotecnología por el Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse, Francia. Su línea de investigación es la Biotecnología Aplicada a los Alimentos. Sus principales proyectos se centran en la producción, caracterización y aplicación de proteínas (enzimas)

en la industria alimentaria.

Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores en el nivel III y ha recibido diversas distinciones, dentro de las que destaca el Premio Nacional en Ciencias y Artes 2003 en el área de Ingeniería y Tecnología.





Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 59-80, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## AVANCES TERAPÉUTICOS EN EL ÁREA DE INMUNOLOGÍA OCULAR

### THERAPEUTIC ADVANCES IN THE OCULAR IMMUNOLOGY AREA.

Jiménez-Martínez María C<sup>1,2\*</sup>, Galicia-Carreón Jorge<sup>2</sup>, Santacruz Concepción<sup>2</sup>, Garfias Yonathan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F. 04510, México.

<sup>2</sup> Departamento de Inmunología, Unidad de investigación, Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana", México D.F. 06800, México

Chimalpopoca 14, Col. Obrera, C.P. 09480. Del. Cuauhtémoc. México, D.F.  
mcjimenezm@bq.unam.mx.Tel. 54421700 ext.3212/ 56232169

### RESUMEN

Esta revisión pretende exponer las características inmunológicas del ojo, los mecanismos de regulación inmunológica que se conocen, los procesos inflamatorios más frecuentes y las propuestas terapéuticas que existen actualmente para el control de procesos inflamatorios.

En esta revisión se exponen las líneas de investigación que son desarrolladas por los autores en relación a los avances terapéuticos en inmunología ocular.

**Palabras clave:** Inmunología ocular, conjuntivitis, extractos dializados de leucocitos, membrana amniótica.

### **ABSTRACT**

This review aims to describe the immunological characteristics of the eye, the mechanisms of ocular immune regulation, the most frequent inflammatory diseases, and the therapeutic approaches that currently exist to control the eye inflammatory processes.

The current research fields, related to the therapeutic advances in ocular immunology developed by the authors, are included in this review.

**Keywords:** Ocular immunology, conjunctivitis, dialyzable leukocyte extracts, amniotic membrane.

### **INTRODUCCIÓN**

El aparato ocular comprende diversas estructuras que permiten la visión y otras que brindan protección e integridad al sistema visual. Entre los componentes que brindan protección al ojo se incluyen las interacciones entre los sistemas nervioso e inmunológico. Esta comunicación permite una regulación extraordinaria entre diferentes mecanismos efectores con el propósito de evitar condiciones de inflamación que podrían alterar el eje visual. A pesar de lo anterior, existen condiciones muy frecuentes en la práctica clínica, como alergias o infecciones, que pueden alterar la superficie ocular y causar daño e inflamación persistente. Debido a lo anterior es sumamente importante conocer los mecanismos inmunológicos de daño, con la finalidad de proponer una respuesta terapéutica efectiva. En esta revisión se encontrarán tres secciones importantes para entender el impacto de las nuevas tendencias terapéuticas:

- I. Inmunofisiología de la superficie ocular y su contexto anatómico.
- II. Inmunofisiopatología de las enfermedades inflamatorias más frecuentes de la superficie ocular: conjuntivitis alérgica y queratitis infecciosas.
- III. Avances terapéuticos en las enfermedades de la superficie ocular.

## **I. Inmunofisiología de la superficie ocular y su contexto anatómico**

El ojo se divide en un segmento anterior y otro posterior, divididos entre sí por el cristalino. El segmento anterior se encuentra en contacto con el medio ambiente a través de la superficie ocular, por lo que presenta múltiples barreras físicas como la órbita, los párpados, las pestañas, la película lagrimal, el epitelio corneal y conjuntival; hacia el interior, el endotelio, el humor acuoso, la malla trabecular, el canal de Schlemm, el epitelio del iris y los procesos ciliares. En contraste, el segmento posterior es menos vulnerable a infecciones, no tiene exposición al exterior y comprende a la retina, coroides, esclerótica y nervio óptico, siendo sus barreras físicas el epitelio pigmentario de la retina, el humor vítreo y la barrera hematoretiniana. A continuación se expondrán los elementos más importantes relacionados con la respuesta inmunológica de la superficie ocular.

### **Sistema lagrimal**

Contiene elementos glandulares secretores y ductales excretores. El sistema secretor está compuesto por la glándula lagrimal principal, localizada en la porción temporal externa de la órbita; por las glándulas accesorias, llamadas glándulas de Krause y Wölfring, situadas en la conjuntiva. Las glándulas de Meibomio situadas en el párpado detrás de las pestañas, secretan oleamidas, ceramidas, monoacilgliceroles. La glándula lagrimal es responsable de secretar diferentes proteínas, electrolitos y agua que ayudan a proteger y nutrir la superficie ocular. Está compuesta por células acinares multilobulares, ductales y mioepiteliales. Las células acinares representan el 80% de la glándula lagrimal y constituyen el sitio de síntesis, almacenamiento y secreción de proteínas que son cruciales para mantener la integridad de la superficie ocular en contra de patógenos, entre las que se encuentran a la lisozima, lactoferrina, fosfolipasa A<sub>2</sub>, factor de crecimiento epidermoide (EGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento de los queratinocitos y proteínas del complemento. Por otro lado, la función de las células ductales es secretar agua y electrolitos; mientras que las células mioepiteliales contienen fibras de actina y favorecen la salida del fluido acinar hacia la superficie ocular.

La película lagrimal constituye una barrera de lubricación trilaminar que cubre conjuntiva y córnea. En la capa anterior se encuentran lípidos no polares, secretados por las glándulas de Meibomio que evitan la evaporación de la lágrima. La capa acuosa media representa el 98% de la película lagrimal, es producida por la glándula lagrimal principal y por las glándulas lagrimales accesorias mencionadas [1]. La capa posterior, que está adherida al epitelio de la superficie

ocular, es una mezcla de mucinas, producidas por células caliciformes en la conjuntiva y de membrana de los epitelios corneal y conjuntival [2]. La función de la película lagrimal es proveer protección física/mecánica y química a la superficie ocular. La protección física/mecánica se debe al lavado de la superficie ocular a través del descenso de la lágrima, desde la glándula en la porción temporal externa de la órbita hasta el sistema de drenaje lagrimal, evitando que agentes patógenos se adhieran al epitelio corneal. Las barreras químicas confieren actividad antimicrobiana, limitando la entrada de patógenos y su crecimiento en la superficie ocular [3].

### **El reflejo lagrimal como mecanismo de inmunidad innata**

La activación del reflejo incrementa el volumen de lágrima, la liberación de proteínas y mucinas, además de que diluye rápidamente sustancias nocivas liberadas por los patógenos invasores. La glándula lagrimal se encuentra innervada por fibras simpáticas, parasimpáticas y sensitivas. Estas terminales nerviosas se encuentran en proximidad con las células acinares, mioepiteliales y ductales, y de los vasos sanguíneos. La estimulación del aparato lagrimal es a través de un arco reflejo procedente de la superficie ocular. La presencia de diferentes estímulos nocivos en la superficie ocular despolariza las fibras sensoriales aferentes en córnea y conjuntiva, los cuales viajan a ganglio trigeminal, para hacer sinapsis en el puente del tallo encefálico y de ahí parten para alcanzar la corteza somatosensorial, en donde el estímulo es procesado e integrado. A continuación, se emiten eferencias que alcanzan el ganglio esfenopalatino, a partir del cual las fibras nerviosas alcanzan la glándula lagrimal y las accesorias. Esta innervación favorece un arco reflejo que induce la secreción lagrimal, evitando el daño durante la exposición de la superficie ocular al estrés ambiental [4] (Fig. 1).

### **Conjuntiva**

Es una mucosa que recubre la porción externa del ojo, desde la porción anterior de la esclera (conjuntiva bulbar), pasando por el fórnix o saco conjuntival, hasta la cara interna de los párpados (conjuntiva tarsal). La conjuntiva está ampliamente vascularizada, sus vasos nacen en el saco conjuntival, corren a través de la conjuntiva bulbar en sus capas superficiales y profundas, se dicotomizan y se adelgazan hacia el limbo, para anastomosarse finalmente con los vasos profundos de la esclera. Esta vascularización muestra implicaciones clínicas, ya que cuando se presenta una respuesta inflamatoria que irrita a la conjuntiva, se genera un grado variable de dilatación o hiperemia. La conjuntiva tarsal, recibe vascularización desde los fondos de saco, que de igual forma tienden a adelgazarse y a dicotomizarse en la medida que se acercan al borde

libre del párpado y a partir de aquí nace una arcada vascular que se une con los vasos provenientes del fondo de saco. Por último, la conjuntiva contiene vasos linfáticos que drenan hacia los ganglios linfáticos auriculares, siendo la única estructura del ojo que contiene drenaje linfático [5].

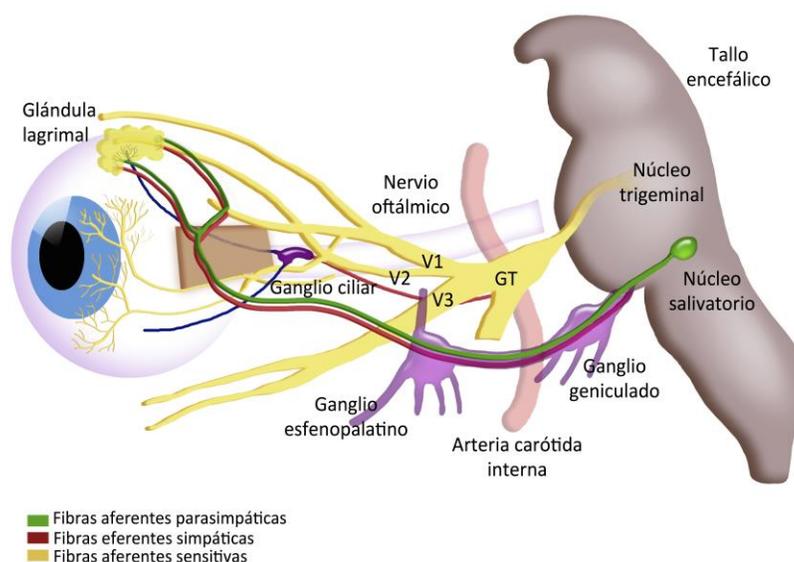


Figura 1. Representación esquemática de la inervación del globo ocular. Se muestra el ganglio trigeminal y su división oftálmica con inervación por las fibras sensoriales sobre la córnea, conjuntiva, glándula lagrimal.

GT. Ganglio Trigeminal; V1. División oftálmica; V2. División maxilar; V3. División mandibular.

Histológicamente, la conjuntiva está constituida por un epitelio cuboidal, estratificado, no queratinizado, con células caliciformes dispuesto sobre tejido conectivo laxo. El epitelio contiene un predominio de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (linfocitos CD3<sup>+</sup> [89±27 células/mm<sup>2</sup>] [7] y células de Langerhans CD1<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> (85±16 células/mm<sup>2</sup>) [8]. En condiciones fisiológicas, el epitelio conjuntival no contiene células inflamatorias [9] (Fig. 2). En el estroma existen áreas dispersas y organizadas de linfocitos, que forman colecciones no encapsuladas de tejido linfoide asociado a conjuntiva (CALT). El CALT forma parte del sistema inmune asociado a mucosas y junto con la glándula lagrimal y la mucosa que recubre el sistema de drenaje lagrimal, forma el tejido linfoide asociado a ojo (EALT) [5,6]. La inervación de la conjuntiva contribuye a la respuesta inflamatoria a través de la liberación de neuromedadores en el microambiente ocular [1] (Fig. 1).

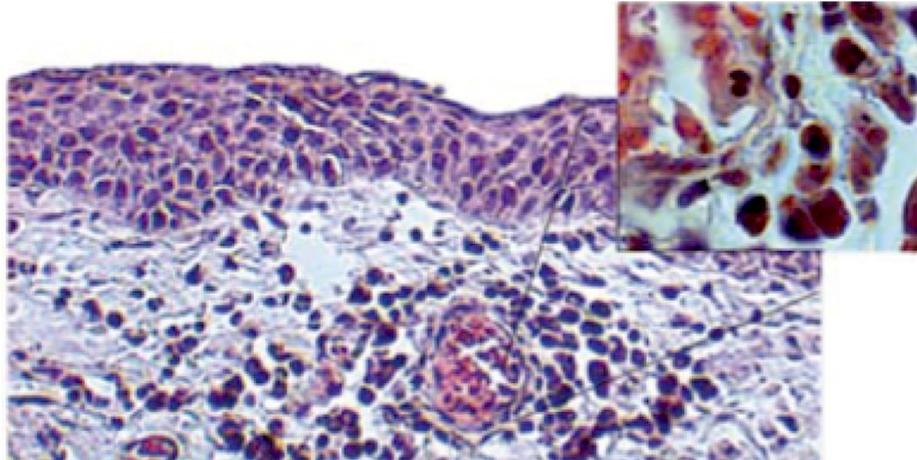


Figura 2. Componentes histológicos de la conjuntiva humana. Biopsia conjuntival humana normal. Se muestra el epitelio conjuntival y el tejido linfoide asociado a conjuntiva (CALT). Tinción con hematoxilina y eosina, (100x). Arriba a la derecha, vasos conjuntivales y migración leucocitaria, (1000x).

### **Limbo esclerocorneal**

Adyacente a la esclerótica y en la periferia de la córnea yace una zona de transición de 1-2 mm de ancho, llamada limbo. El limbo es la fuente de células madre epiteliales (células troncales) y es el sitio donde terminan los vasos sanguíneos conjuntivales y esclerales. La función de las células limbales humanas (huLEC) es originar las células epiteliales corneales, reparando la superficie corneal. Las huLEC expresan factores anti-angiogénicos y angiogénicos que se encuentran en equilibrio y que impiden la formación de vasos corneales. En condiciones inflamatorias crónicas de la superficie corneal, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), está implicado en la estimulación de células endoteliales y generación de nuevos vasos sanguíneos, un proceso llamado neovascularización corneal [10].

### **Córnea**

La córnea es un tejido transparente avascular, organizado en seis capas: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Dua, membrana de Descemet y endotelio [11]. Las características inmunocompetentes de la córnea se deben a la presencia de células presentadoras de antígeno (APC). Las principales APC del epitelio corneal son células dendríticas (DC), ampliamente distribuidas en epitelio y estroma. Las DC juegan un papel fundamental en la

regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa. Entre las funciones de estas células resalta la activación de linfocitos T vírgenes, a través de moléculas de MHC e inducción de tolerancia.

El epitelio corneal expresa moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) no clásicas, mientras que en el estroma corneal existen un número significativo de DC, las características de maduración de estas células está determinada por la expresión de CD45, CD11b, CD11c, CD40, CD80 o CD86 que son moléculas de superficie celular, que activan a linfocitos T, dependiendo del tipo de molécula expresado se puede conocer el estado de maduración de una DC. Hasta hace algún tiempo, se consideró que las DC maduras sólo se encontraban en conjuntiva y en la periferia de la córnea, con expresión de MHC-II<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup> y CD86<sup>+</sup>. No obstante, en los últimos años se observó la presencia de DC que expresan MHC-II<sup>+</sup> y CD45<sup>+</sup> en la parte central del estroma corneal. En condiciones no patológicas, las células de Langerhans (LC) son las únicas que expresan de manera constitutiva MHC-II en córnea. En contraste, las DC inmaduras presentan alta capacidad de procesamiento antigénico, y poca estimulación de linfocitos T. Lo anterior debido a una baja expresión de MHC-II y de CD40, CD80 y CD86. Sin embargo, si la DC es activada, tiene la capacidad de elevar la expresión de MHC-II y de las moléculas coestimuladoras. Los estímulos que activan a las DC en córnea son traumatismos, infecciones y manipulación de tejidos. Las APC que se encuentran en la periferia de la córnea son CD11c<sup>+</sup>, pero también pueden expresar CD80, CD86 y CD40. Estas DC corneales y conjuntivales intraepiteliales parecen ser un equivalente de las LC de la piel. Adicionalmente, la córnea puede albergar DC derivadas de la médula ósea con capacidad funcional. De tal manera que la expresión de moléculas de MHC y de moléculas coestimuladoras en las DC corneales es fundamental para mantener tanto sus propiedades tolerogénicas, como para favorecer sus funciones inmunogénicas [12].

Por otra parte, la córnea es la estructura con mayor inervación sensitiva del cuerpo, contiene aproximadamente 7000 nociceptores/mm<sup>2</sup> provenientes del nervio trigeminal [13] (Fig. 1). Se sabe por modelos animales que las fibras sensoriales que inervan la córnea son principalmente fibras A $\delta$  y C. Las fibras A $\delta$  están compuestas por axones ligeramente mielinizados, de 2-6  $\mu$ m de diámetro, conducen con una velocidad intermedia (4-30 m/sg) y suelen ser polimodales, respondiendo a distintos estímulos ambientales; las fibras C no mielinizadas, están conformadas por axones de 0.4–1.2  $\mu$ m, asociadas a la transmisión de estímulos nocivos [14]. Las fibras A $\delta$  y C constituyen nociceptores que surgen de

los ganglios de la raíz dorsal y del trigémino, ambos tipos de fibras responden a una gran variedad de estímulos físicos como calor, frío, osmolaridad, luz ultravioleta, trauma y agentes químicos (irritantes, pH, proteasas). La diversidad de los estímulos, inicia la despolarización de las terminales nerviosas, liberando diferentes neuropéptidos hacia la superficie ocular, en un proceso conocido como inflamación neurogénica [15]. Entre los neuromediadores liberados se encuentran el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, la sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo y el neuropéptido Y. Estos neuropéptidos influyen en una gran variedad de funciones fisiológicas de la superficie ocular como vasodilatación, inflamación aguda, diferenciación, secreción y cicatrización [15].

Para regular el proceso inflamatorio, el epitelio y endotelio corneal expresan proteínas que regulan negativamente la activación del complemento, evitando el daño ocular. Entre estas proteínas se encuentran, proteína cofactor de membrana (CD46), factor acelerador del decaimiento (CD55) y la protectina (CD59) [Revisado en 16].

### **Receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)** ***Receptores tipo Toll (TLR)***

La capacidad de la superficie ocular de montar una respuesta inmune se atribuye en parte a los TLR, ya que pueden reconocer diferentes PAMPs presentes en estructuras de bacterias, virus, hongos y protozoarios. Los TLR son proteínas transmembranales tipo I, con un dominio extracelular rico en leucina y dominios intracelulares llamados TIR (dominio Toll/IL-1 receptor), que presentan homología con el dominio intramembranal del receptor para IL-1. La señalización vía TLR, genera cambios funcionales que incluyen producción de citocinas, quimiocinas y la expresión de moléculas de adhesión, jugando un papel fundamental en la respuesta inmune a agentes infecciosos en la superficie ocular (Tabla I). Asimismo, también favorecen la respuesta inmune adaptativa, mediante el incremento en la expresión de MHC-II y de moléculas coestimuladoras en APC residentes. Estas dos ramas de la respuesta inmune protegen la superficie ocular de la infección microbiana, pero en algunos casos las secuelas de la respuesta inflamatoria pueden resultar en un daño mayor de la superficie ocular, más allá del producido por la infección inicial, causando alteraciones en la función visual [17].

### **Receptores tipo NOD (NLR)**

Son proteínas que poseen un dominio de unión a PAMPs, un dominio de oligomerización de unión a nucleótido (NOD) y un dominio que recluta caspasas. Los NLR forman parte del inflamosoma y su señalización activa la producción de

citocinas proinflamatorias. Se ha demostrado que mutaciones en NOD2 inducen un fenotipo hiperfuncional caracterizado por artritis, rash cutáneo y uveítis (síndrome de Blau), en donde existe una gran cantidad de IL-6 e IL-8 en humor acuoso y vítreo [18]. Mutaciones en otras proteínas NLR como NLRP1, han sido asociadas a disqueratosis intraepitelial corneal [19]. La expresión de receptores NLR en tejidos oculares se encuentra en la Tabla I.

## **II. Inmunofisiopatología de las enfermedades inflamatorias de la superficie ocular**

### ***Conjuntivitis alérgica.***

En los últimos años, los padecimientos alérgicos se han incrementado alrededor del mundo. La prevalencia de enfermedades alérgicas para nuestro país oscila de 8 a 11%, siendo las más frecuentes asma y rinoconjuntivitis alérgica [20] Asimismo, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) ha reportado que todos los tipos de conjuntivitis se encuentran dentro de las diez primeras causas de morbilidad en nuestra población y en el Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”, un centro de referencia oftalmológica nacional, la conjuntivitis alérgica (CA) representó la sexta causa de consulta médica para todas las edades y la segunda causa de consulta en la edad pediátrica y adolescencia durante 2013 [21]

La CA se define como una inflamación conjuntival bilateral, brusca e intensa, generalmente autolimitada, provocada por el contacto de un antígeno (Ag) con la conjuntiva bulbar y/o tarsal, en un individuo previamente sensibilizado. Si la estimulación antigénica continúa, aparecen cambios irreversibles en la superficie ocular. Las manifestaciones clínicas de la CA son prurito, sensación de cuerpo extraño, eritema, secreción, ardor, lagrimeo y fotofobia [22].

Tabla I. Expresión de receptores de PAMPs en tejidos oculares.

	Ligando	Localización en ojo
TLR1	Triacil lipopéptidos	Córnea, conjuntiva, RPE
TLR2	Glicolípidos, lipoproteínas, PGN, LTA, zimosan	Córnea, conjuntiva, RPE
TLR3	ARNds (virus)	Córnea, conjuntiva, RPE
TLR4	LPS, RSV	Córnea, conjuntiva, iris, cuerpo ciliar, coroides, retina, RPE
TLR5	Flagelina	Córnea, RPE
TLR6	Diacil lipopéptidos	Conjuntiva, RPE
TLR7	ARNss (virus)	Córnea, conjuntiva, RPE
TLR8	ARNss (virus)	ND
TLR9	ADN (bacterias), ADNds (virus)	Córnea, conjuntiva, RPE
TLR10	ND	
TLR11	Profilina	Segmento anterior y posterior, HCE
NOD1	iE-DAP	HCE, segmento anterior y posterior
NOD2	MDP	HCE, segmento anterior y posterior
NALP1	Ruptura celular	HCE, segmento posterior
NALP2	ND	HCE, segmento posterior
NALP3	ARN bacteriano, toxinas, ATP, ácido úrico	HCE, segmento posterior
NALP1	ND	Segmento posterior

ADN.- ácido desoxirribunucleico; ADNds.- ácido desoxirribunucleico de cadena doble; ARNds.-ácido ribonucleico de doble cadena; ARNss.- ácido ribonucleico de cadena simple; ATP.-adenosintrifosfato; HCE.- epitelio corneal humano; IE-DAP.-ácido  $\gamma$ -glutamil diaminopimélico; LTA.- ácido lipoteicoico; RPE.- epitelio pigmentario de retina; PGN.- peptidoglucano; RSV.- virus sincitial respiratorio; ND.-no determinado

### Cambios inmunológicos durante la alergia ocular

La respuesta inmunológica en CA corresponde a una reacción de hipersensibilidad inmediata mediada por IgE. Se han identificado dos fases:

A) Fase de sensibilización. En el modelo murino, un primer contacto con el Ag en el CALT, activa a las DC y a los linfocitos T que localmente inducen IL-4 e IL-13, favoreciendo la activación de linfocitos B y síntesis de IgE. En pacientes con CA agudas (estacional y perenne) y crónicas (queratoconjuntiviitis primaveral –QCP-), se ha reportado IgE lágrimal. En biopsias de pacientes con QCP, se han

descrito linfocitos B CD23+CD21+CD40+, sugiriendo que pueden ser productores de IgE lagrimal [23]. Además, en pacientes con queratoconjuntivitis atópica (QCA) y con QCP se ha observado un infiltrado importante de basófilos y células cebadas que expresan el receptor de alta afinidad para IgE [24].

B) Fase efectora. Se presenta en el segundo contacto con el Ag, generando una respuesta inflamatoria local. Se divide en una etapa temprana y una tardía.

- Reacción temprana. Las células efectoras sensibilizadas por el Ag incluyen a células residentes (mastocitos) y otras que han migrado (eosinófilos y basófilos) a conjuntiva. El reconocimiento del Ag a través de la IgE, genera degranulación y liberación de mediadores preformados, como histamina. La histamina se une a sus receptores en endotelio, fibras neuronales y epitelio conjuntival generando los síntomas cardinales de la alergia ocular (comezón, eritema, lagrimeo, quemosis y edema palpebral). Los receptores de histamina H1, H2, H3 y H4 son expresados en las células caliciformes y favorecen la secreción de mucinas después de la estimulación alérgica [25]. En pacientes con QCP, se ha reportado un incremento en la expresión de receptores H4 en las células infiltrantes de conjuntiva [26]. La activación de los mastocitos conjuntivales por IgE es relevante, ya que en condiciones fisiológicas existen aproximadamente 6000 células cebadas/mm<sup>3</sup>. En pacientes con CA estacional y con QCA se ha reportado un incremento en la densidad de estas células. La activación de las células cebadas y eosinófilos induce la liberación de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, metaloproteinasas y proteína catiónica de eosinófilos, generando fibrosis en CA crónicas. [27-29].

- Reacción tardía. Existe infiltración conjuntival de eosinófilos y linfocitos T CD4+ CCR3+. En sangre periférica, nuestro grupo de investigación ha demostrado en pacientes con CA perenne, un incremento de linfocitos T CCR4+ CCR9+ (Fig. 3) capaces de producir de IL-5, IL-6 e IL-8 después del estímulo con el Ag (Fig. 4) y decremento en el número de linfocitos T reguladores (Treg) CD4+CD25+FOXP3+ circulantes [30]. Estas alteraciones inmunológicas, favorecen la activación de las poblaciones Th1 y Th2 locales, como se ha demostrado en pacientes con QCP, en donde existen cantidades importantes de IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  en lágrima. Estas citocinas se han asociado con daño a la superficie ocular en CA [28-29].

**Infecciones de la superficie ocular**  
**Queratitis infecciosas**

Alrededor del mundo las queratitis infecciosas (QI) generan de 1.5-2 millones de nuevos casos de ceguera al año. Las QI son 90% más frecuentes en países en desarrollo, que en países desarrollados. La Organización Mundial de la Salud ha reconocido que las QI son la segunda causa de pérdida de visión y ceguera después de catarata [31].

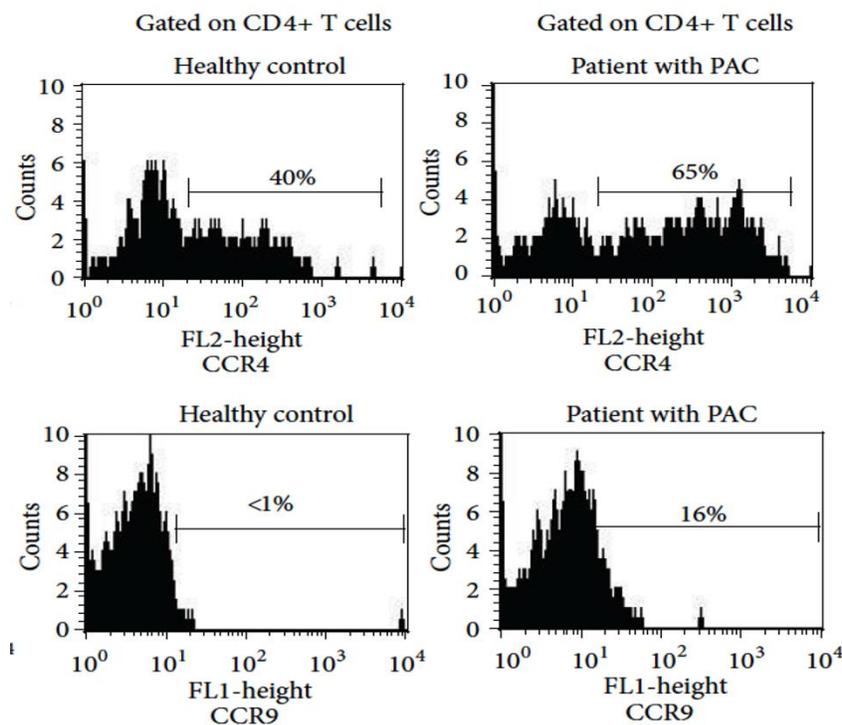


Figura 3. Expresión de CCR4 y CCR9 en linfocitos T CD4+ de circulación periférica de pacientes con conjuntivitis alérgica perenne (PAC, por sus siglas en inglés). Se muestran histogramas representativos de la expresión de CCR4 y CCR9 en linfocitos T CD4 en individuo sano (izquierda) y en paciente con PAC (derecha). Esta imagen tiene licencia Creative Commons que permite su uso irrestricto, distribución y reproducción en cualquier medio siempre y cuando la obra original sea apropiadamente citada. (Galicia *et al.* Clin Dev Immunol 2013; 2013, 1-11)

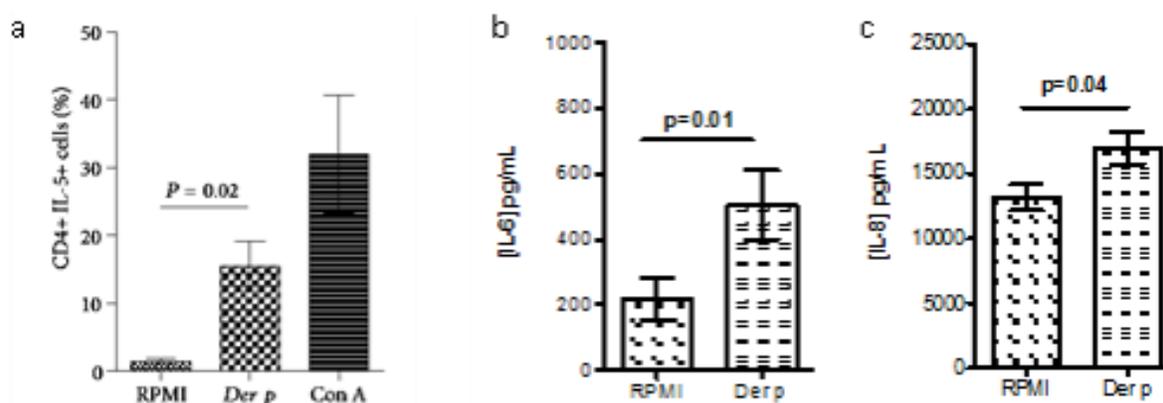


Figura 4. Producción de citocinas después del estímulo alérgeno-específico en pacientes con PAC. a) IL-5 intracelular, b) IL-6 e c) IL-8 en sobrenadante de cultivo. La Imagen (a) tiene licencia Creative Commons que permite su uso irrestricto, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre y cuando la obra original sea apropiadamente citada (Galicia *et al.* Clin Dev Immunol 2013; 2013, 1-11).

Los factores de riesgo que favorecen la aparición de QI son trauma ocular, cirugía ocular previa, enfermedades sistémicas, abuso de antibióticos y antiinflamatorios tópicos, entre otros [32, 33]. En nuestro medio, los microorganismos infecciosos más comúnmente aislados en QI son bacterias (*S. aureus* y *S. pneumoniae*) y hongos (*Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y *Candida spp.*) [34] (Fig. 5).

### Cambios inmunológicos durante las queratitis infecciosas

Son pocos los estudios sobre los cambios inmunológicos en QI en humanos. Vasanti *et al.* [35] demostraron que en queratitis micóticas existe infiltración corneal importante de polimorfonucleares y que el daño corneal es proporcional al tiempo de evolución. Por otra parte, Yamaguchi *et al.* [36] demostraron que existen cambios en la frecuencia de las DC durante los procesos infecciosos corneales inducidos por bacterias. Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que en pacientes con QI (bacterianas y fúngicas) es una constante el incremento significativo de las citocinas proinflamatorias IL-8, IL-6 e IL-1b en lágrima, sugiriendo que estas citocinas podrían ser blanco de terapias biológicas durante las infecciones de la superficie ocular [37].

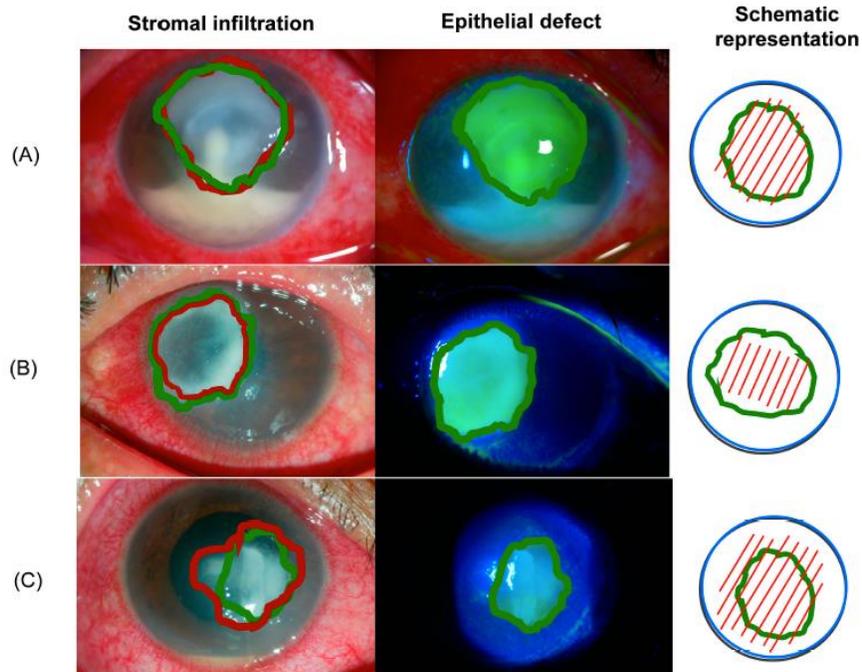


Figura 5. Fotografías clínicas características de queratitis infecciosas en humanos. A) Ojo infectado por bacteria gram-positiva. Se observa hiperemia conjuntival con infiltración corneal (rojo) de tamaño similar al defecto epitelial (verde), deposición central en forma de fuente unida a hipopion y reacción cremosa en cámara anterior. El microorganismo identificado fue *S. pneumoniae*. B) Ojo infectado por bacteria gram-negativa. Se observa infiltración estromal (rojo), aparentemente rodeada por el defecto epitelial (verde). El microorganismo identificado fue *Pseudomonas spp.* C) Ojo infectado con hongo. Se observa un defecto epitelial central (verde) e infiltración estromal (rojo) con aparente imagen plumosa rodeando la lesión. No se observa lisis y el hipopion es blanco cremoso. El microorganismo identificado fue *Fusarium spp.* En C, se muestra la representación esquemática de acuerdo al tamaño epitelial (verde) y la infiltración estromal (roja). Los defectos epiteliales fueron observados con filtro azul de cobalto. Esta imagen tiene licencia Creative Commons que permite su uso irrestricto, distribución y reproducción en cualquier medio siempre y cuando la obra original sea apropiadamente citada (Santacruz *et al.* Int. J. Mol. Sci. 2015; 16, 4850-4864).

### III. Avances terapéuticos en las enfermedades de la superficie ocular

#### Avances terapéuticos en conjuntivitis alérgica

El tratamiento de las CA representa un desafío para el clínico, debido a los diversos mecanismos inmunológicos involucrados en el daño ocular [Revisado en 22]. A la fecha existen una gran cantidad de medicamentos tópicos disponibles, sin embargo existen una serie de pasos encaminados a resolver las molestias clínicas de los pacientes.

Esquema terapéutico actual. En el primer nivel de tratamiento, se debe identificar al Ag causal y evitar la exposición al mismo, favoreciendo la lubricación ocular para el aclaramiento del Ag y como medida de tratamiento para el ojo seco, usualmente asociado al proceso alérgico. En el segundo nivel, se encuentra el uso de antialérgicos tópicos, de tal manera que en el caso de las conjuntivitis agudas se controlen las manifestaciones clínicas y en las crónicas se evite un daño mayor. Debido a lo anterior la eficacia del tratamiento dependerá del estado clínico y severidad de afectación de la superficie ocular, por lo que en este nivel de atención existen una gran variedad de medicamentos como anti-histamínicos, estabilizadores de células cebadas, anti-inflamatorios no esteroideos y corticoesteroides como un tercer nivel de tratamiento [Revisado en 38]. En todos los casos la elección de los medicamentos tópicos deberá individualizarse. Sin embargo, en muchas ocasiones estos tratamientos no son suficientes y la necesidad de controlar el proceso inflamatorio de la superficie ocular hace necesario un cuarto nivel terapéutico, en la actualidad existe toda una tendencia de investigación en diferentes productos con enfoque hacia la inmunomodulación:

a) Inhibidores de calcineurina y queratoconjuntivitis atópica. Los inhibidores de calcineurina son capaces de inducir inmunosupresión local, más que inmunomodulación. La ciclosporina tópica y sistémica, así como el tacrolimus tópico, han sido utilizados en el control de QCA severa [39-41]. Aparentemente son efectivos en controlar la inflamación ocular bloqueando la proliferación de linfocitos Th2 y la producción de IL-2. La ciclosporina además es efectiva en reducir la inflamación por eosinófilos, aparentemente a través de la inhibición de IL-5. Se ha sugerido que el uso de ciclosporina es útil en pacientes con CA crónicas, para eliminar la dependencia de esteroides [39-41].

b) Omalizumab. Omalizumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio Cε3 de la IgE. Tiene la capacidad de unirse con IgE libre y previene que la IgE libre se una a sus receptores de alta afinidad en las células cebadas, basófilos y células dendríticas [42]. Omalizumab ha sido estudiado en asma, urticaria, rinitis estacional y recientemente se ha propuesto su uso en pacientes con queratoconjuntivitis primaveral severa y queratoconjuntivitis atópica severa [43-44]. Sin embargo, en la actualidad se requieren más estudios para evaluar correctamente su indicación en alergias oculares

c) Inmunoterapia antígeno-específica (Desensibilización alérgeno-específica). Descrita por Noon y Freeman en 1911, la inmunoterapia antígeno-específica ha sido ampliamente estudiada en asma y rinitis alérgica. Sin embargo

en alergia ocular aún no existen estudios que demuestren su eficacia, siendo ésta una de las líneas de investigación de los autores de esta revisión. El objetivo es exponer al paciente a dosis crecientes de Ag durante tiempos relativamente largos (3-5 años) de tal manera que se favorezca la tolerancia contra ese Ag en particular [45]. Existen varios tipos de inmunoterapia, pero las más utilizadas son la inmunoterapia subcutánea y la sublingual. Dentro de los posibles mecanismos de acción que explican las actividades inmunomoduladoras de la inmunoterapia subcutánea es la inducción de IFN- $\gamma$ , existen algunos reportes aislados de su uso durante las conjuntivitis estacionales. Por otra parte la Inmunoterapia sublingual induce células Treg y cambio en el isotipo hacia IgG4. En la actualidad existen varios reportes en donde se ha sugerido su uso en rinoconjuntivitis alérgica con buena respuesta clínica [46]. Estudios preliminares en nuestro laboratorio sugieren un incremento en el IFN- $\gamma$  lagrimal a los 6 meses de tratamiento, lo que se asocia a una mejoría clínica notable [47].

### **Avances terapéuticos en queratitis infecciosas**

Esquema terapéutico actual. Sin duda el esquema terapéutico en QI corresponde a la correcta identificación de microorganismos causal y a la determinación de la sensibilidad a medicamentos del mismo. Desafortunadamente en la práctica cotidiana, esto no es tan rápido, ni eficiente, ya que el incremento en la resistencia a medicamentos hace cada vez más difícil elegir el tratamiento adecuado, la virulencia del microorganismo puede contribuir a la rapidez de la lesión ocular, además de que puede existir coinfección de más de un organismo al mismo tiempo, de ahí que exista la necesidad de estudiar inmunomoduladores que coadyuven y faciliten el tratamiento en QI.

a) Extractos dializados de leucocitos humanos (EDL). Los EDL fueron descritos por Lawrence en 1955, quien demostró que la respuesta celular podía ser transferida de un individuo previamente sensibilizado a un Ag a otro individuo no sensibilizado [48]. Los EDL están constituidos por una mezcla de péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa) y sus efectos adyuvantes están asociados con la modulación de IFN- $\gamma$ , favoreciendo la respuesta inmunológica hacia una respuesta Th1. En México, el único EDL autorizado para su uso en humanos es Transferon®, el cual es un medicamento producido en la Unidad de Investigación, Desarrollo e Innovación Médica y Biotecnológica (UDIMEB) de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Su manufactura para uso en humanos se apega a las buenas prácticas de fabricación y la normatividad vigente, esta aclaración es indispensable debido a que los siguientes datos en corresponden exclusivamente a Transferon.

Perfil cromatográfico y eficacia biológica. Transferon es una mezcla de péptidos no polares, con perfil cromatográfico constante y reproducible de lote a lote [49]. Esto asegura que en el empleo clínico siempre se esté utilizando una misma mezcla de péptidos en una concentración constante de 2mg/5mL. La eficacia biológica ha sido demostrada *in vitro*, al exponer a células Jurkat a Transferon, en las que se induce producción de IFN- $\gamma$ ; e *in vivo*, en un modelo preclínico de herpes murino, en el que aumenta la sobrevivencia a la infección herpética (mortal en ratones) y la producción de IFN-g [50].

En oftalmología se ha utilizado como adyuvante en el tratamiento de QI, bacterianas, micóticas y virales, favoreciendo el control de la inflamación ocular y limitando rápidamente el proceso infeccioso (Fig. 6). Así, diversos reportes donde se ha evaluado la eficacia clínica de Transferon como adyuvante en QI, se ha observado un incremento en la frecuencia de linfocitos T CD4+IFN- $\gamma$ + y CD8+ IFN- $\gamma$ + [51, 52]. Adicionalmente a su capacidad moduladora Th1, nuestro grupo de investigación ha demostrado que Transferon disminuye la producción de IL-8 e IL-6 en células epiteliales limbales, lo que sugiere que puede regular negativamente la respuesta inflamatoria de la superficie ocular [53].

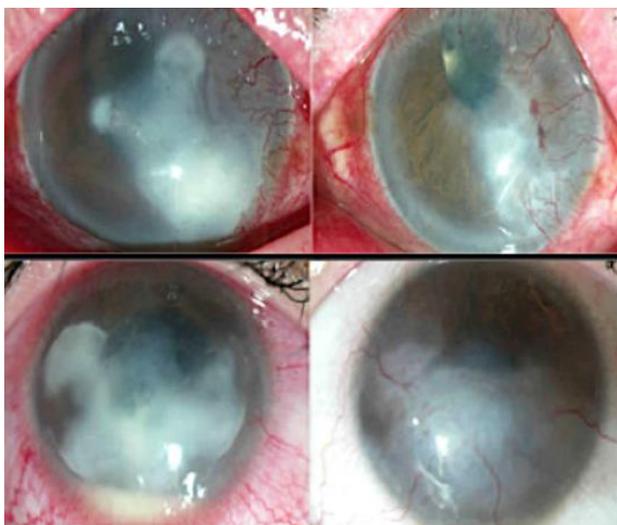


Figura 6. Fotografías clínicas de pacientes con queratitis herpética. Fotografías Superiores. Paciente tratado exclusivamente con Aciclovir al tiempo 0 (izquierda) y después de tres meses (derecha). Fotografías Inferiores, paciente tratado con Aciclovir + Transferon al tiempo 0 (Izquierda) y después de tres meses (derecha). Se observa que el paciente que recibió Transferon como adyuvante control del proceso infeccioso y del estado inflamatorio. Esta imagen tiene licencia Creative Commons que permite su uso irrestricto, distribución y reproducción en cualquier medio siempre y cuando la obra

original sea apropiadamente citada (Santacruz-Valdes C, et al. Treatments of Infectious and Allergic Conjunctivitis; Is the Immunomodulation the Future?. En Common Eye Infections. In Tec

### **b) Membrana amniótica como inmunomodulador en queratitis infecciosas.**

La membrana amniótica (MA) es la capa más interna de las membranas fetales en contacto con el feto. Se ha documentado ampliamente que el trasplante de MA es benéfico en diferentes enfermedades de la superficie ocular. Lo anterior debido a que promueve la epitelización, inhibe la angiogénesis, se utiliza para la expansión *ex vivo* de células epiteliales corneales/limbales y células endoteliales [Revisado en 54]. Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que la MA es capaz de inducir apoptosis, inhibir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica y abolir la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias inclusive si han sido estimuladas en presencia de LPS [55]. En modelos animales de QI por *S. aureus*, la MA es capaz de mejorar la velocidad curación de la lesión corneal y de disminuir la neovascularización [56]. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados con sus efectos terapéuticos en humanos son línea de investigación de los autores de esta revisión (Fig. 7).

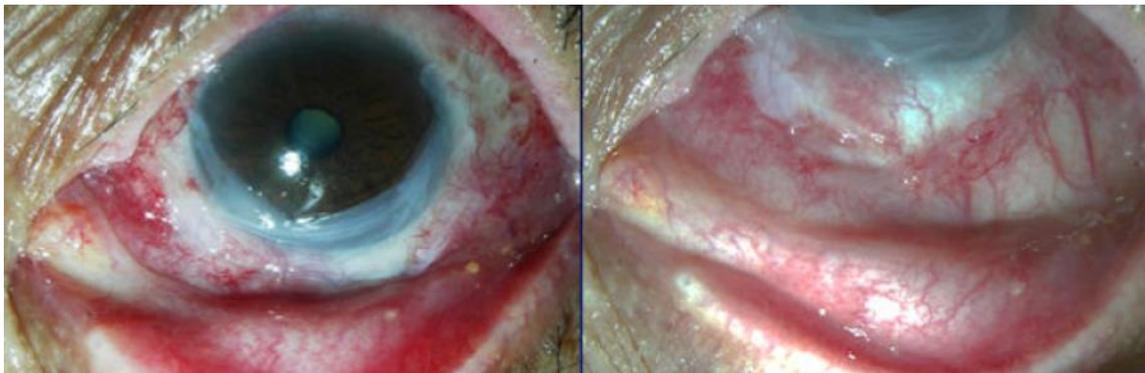


Figura 7. Fotografías clínicas de aplicación de Membrana Amniótica sobre la superficie ocular en una paciente femenina de 67 años de edad con historia de QI periférica secundaria a triquiasis. Izquierda. MA que cubre el defecto epitelial corneal. Derecha. Misma paciente, 15 días después. Se observa mejoría clínica importante con control de la hiperemia y la inflamación. Esta imagen tiene licencia Creative Commons que permite su uso irrestricto, distribución y reproducción en cualquier medio siempre y cuando la obra original sea apropiadamente citada. (Santacruz-Valdes C, et al. Treatments of Infectious and Allergic Conjunctivitis; Is the Immunomodulation the Future?. En Common Eye Infections. In Tech. 2013. P. 45-60)

De la misma manera, en nuestro laboratorio hemos conseguido utilizar la membrana amniótica como soporte para células troncales de donadores cadavéricos, favoreciendo el uso de la MA como herramienta de la terapia regenerativa en la reparación de la superficie corneal. Cabe señalar que esta tecnología es única e innovadora en nuestro país y para su aplicación en pacientes se cuenta con la licencia sanitaria 14-TR-09-015-0006 emitida por COFEPRIS para banco de tejidos corneal y uso de amnios con fines trasplante.

En conclusión, el estudio de los mecanismos inmunológicos involucrados en el daño ocular es fundamental para conocer y proponer nuevos avances terapéuticos en el área de la inmunología ocular, enfocados al control de la respuesta inflamatoria en diversas enfermedades del ojo.

## REFERENCIAS

1. Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. (2004) *Exp Eye Res.* **78**, 409-416.
2. Govindarajan B, Gipson IK. (2010) *Exp Eye Res.* **90**, 655-663.
3. Dartt DA. (2011) *Ocul Surf.* **9**, 126-138.
4. Galicia-Carreón J, Alonso-Sánchez M, Chávez R, Jiménez-Martínez MC. Aspectos neuroinmunitarios del aparato de la visión. En Efectos No Convencionales de las Citocinas, editor UAM. Mexico; 2013. P. 77-102.
5. Knop E, Knop N. (2007) *Chem Immunol Allergy.* **92**, 36-49.
6. Knop E, Knop N. (2005) *J Anat.* **206**, 271-285.
7. Soukiasian SH, Rice B, Foster CS, Lee SJ. (1992) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **33**, 453-459.
8. Dua HS, Gomes JA, Donoso LA, Laibson PR. (1995) *Eye* **9**, 261-267.
9. McDermott AM, Perez V, Huang AJ, Pflugfelder SC, Stern ME, Baudouin C, et al. (2005) *Ocul Surf.* **3**, S131-S138.
10. Philipp W, Speicher L, Humpel C. (2000) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **41**, 2514-2522.
11. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. (2013) *Ophthalmology* **120**, 1778-1785.
12. Novak N, Siepmann K, Zierhut M, Bieber T. (2003) *Trends Immunol.* **24**, 570-574.
13. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. (2003) *Exp Eye Res.* **76**, 521-542.
14. Beuerman RW, Stern ME. (2005) *Ocul Surf.* **3**, S203-206.
15. Micera A, Lambiase A, Bonini S. (2008) *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* **8**, 466-471.
16. Jiménez-Martínez MC, Carrera-Cardenas I, Pedroza-Seres M, Schalen B, Jaimes P, Garfias Y. (2006) *Rev Alerg Mex* **53**, 226-235.
17. Redfern RL, McDermott AM. (2010) *Exp Eye Res.* **90**, 679-687.

18. Jimenez-Martínez MC, Cruz F, Groman-Lupa S, Zenteno JC. (2011) *Int J Immunogenetics* **2011**, 1-10.
19. Soler VJ, Tran-Viet KN, Galiacy SD, Limviphuvadh V, Klemm TP, St Germain E, et al. (2013) *J Med Genet.* **50**, 246-54.
20. Larenas-Linnemann D, et al. (2014) *Rev Alerg Mex.* **61**, S3-S116.
21. Pantoja-Meléndez C. (2013). Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”. *Unidad de Vigilancia Epidemiológica*. P.1-6.
22. Robles-Contreras A, Santacruz C, Ayala J, Bracamontes E, Godínez V, Estrada-García I, Estrada-Parra S, Chávez R, Pérez-Tapia M, Bautista-De Lucio V, Jimenez-Martínez MC. Allergic conjunctivitis: an immunological point of view. En *Conjunctivitis: A Complex and Multifaceted Disorder*. InTech. Rijeka, Croatia; 2011. P. 33-56.
23. Abu El-Asrar AM, Fatani RA, Missotten L, Geboes K. (2001) *Eye* **15**, 217-224.
24. Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Okayama Y, Watanabe Y, Kawasaki S, et al. (2010) *Br J Ophthalmol.* **94**, 513-518.
25. Hayashi D, Li D, Hayashi C, Shatos M, Hodges RR, Dartt DA. (2012) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **53**, 2993-3003.
26. Leonardi A, Di Stefano A, Vicari C, Motterle L, Brun P. (2011) *Allergy.* **66**, 1360-1366.
27. Leonardi A, Sathe S, Bortolotti M, Beaton A, Sack R. (2009) *Allergy.* **64**, 710-717.
28. Leonardi A, Fregona IA, Plebani M, Secchi AG, Calder VL. (2006) *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* **244**, 1240-1245.
29. Aguilar-Velázquez G, Santacruz-Valdés C, Robles-Contreras A, Ayala-Balboa J, Bautista-de-Lucio V, Chávez R, Estrada-Parra S, Garfias Y, Pérez-Tapia M, Jimenez-Martínez MC. Tear TNF as a Potential Link in the Pathogenesis of Allergic Conjunctivitis. Correlation between Tear IFN $\gamma$ /IL-5 and Clinical Data. World Allergy Congress. Medimond s.r.l. International Proceedings, Italy; 2009, P.13-17.
30. Galicia-Carreón J, Santacruz C, Ayala-Balboa J, Robles-Contreras A, Pérez-Tapia SM, Garfias Y, et al. (2013) *Clin Dev Immunol* **2013**, 1-11.
31. World Health Organization. Global Initiative for the Elimination of Avoidable Blindness: Action plan 2006–2011, Vision 2020. The right to sight, 2007. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43754/1/9789241595889\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43754/1/9789241595889_eng.pdf?ua=1). Consultado en línea 20 marzo 2015.
32. Saha S, Banerjee D, Khetan A, Sengupta J. (2009) *Oman J Ophthalmol.* **2**, 114–118.
33. Gonzales CA, Srinivasan M, Whitcher JP, Smolin G. (1996) *Ophthalmic Epidemiol.* **3**, 159-166.
34. Hernández Camarena JC, Bautista de Lucio VM, Chirinos-Saldaña P, Navas A, Ramírez Miranda A, Climent-Flores A, et al. (2013) *Rev Mex Oftalmol.* **87**, 100-109.
35. Vasanthi M, Prajna NV, Lalitha P, Mahadevan K, Muthukkaruppan V. (2007) *Indian J Ophthalmol.* **55**, 27-31.

36. Yamaguchi T, Calvacanti BM, Cruzat A, Qazi Y, Ishikawa S, Osuka A, *et al.* (2014) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 7457-7466.
37. Santacruz C, Linares M, Garfias Y, Loustaunau LM, Pavon L, Perez-Tapia SM, Jimenez-Martinez MC. (2015) *Int. J. Mol Sci.* **16**, 4850-4864.
38. Santos MS, Alves MR, Freitas Dd, Sousa LB, Wainsztein R, Kandelman S, *et al.* (2011) Ocular allergy Latin American consensus. *Arq Bras Oftalmol.* **74**, 452-456.
39. Cornish KS, Gregory ME, Ramaesh K. (2010) *Eur J Ophthalmol.* **20**, 844-851.
40. Tzu JH, Utine CA, Stern ME, Akpek EK. (2012) *Cornea.* **31**, 649-654.
41. Virtanen HM, Reitamo S, Kari M, Kari O. (2006) *Acta Ophthalmol Scand.* **84**, 693-695.
42. Vichyanond P. (2011) *Asian Pac J Allergy Immunol.* **29**, 209-219.
43. de Klerk TA, Sharma V, Arkwright PD, Biswas S. (2013) *J AAPOS.* **17**, 305-306.
44. Taillé C, Doan S, Neukirch C, Aubier M. (2010) *BMJ Case Rep.* **2010**, 1-3.
45. Shakir EM, Cheung DS, Grayson MH. (2010) *Ann Allergy Asthma Immunol.* **105**, 340-347.
46. Chelladurai Y, Suarez-Cuervo C, Erekosima N, Kim JM, Ramanathan M, Segal JB, Lin SY. (2013) *J Allergy Clin Immunol Pract.* **1**, 361-369.
47. Aguilar-Velázquez G, Santacruz C, Hernández PM, Chávez R, Ayala-Balboa J, Estrada-Parra S, *et al.* (2012) *World Allergy Organ J.* **5**, S37.
48. Lawrence HS. (1955) *J Clin Invest.* **34**, 219-230.
49. Medina-Rivero E, Merchand-Reyes G, Pavón L, Vázquez-Leyva S, Pérez-Sánchez G, Salinas-Jazmín N, *et al.* (2014) *J Pharm Biomed Anal.* **88**, 289-294.
50. Salinas-Jazmín N, Estrada-Parra S, Becerril-García MA, Limón-Flores AY, Vázquez-Leyva S, Medina-Rivero E, *et al.* (2014). *J Immunol Res* 2014, 1-9.
51. Luna-Baca GA, Linares M, Santacruz-Valdes C, Aguilar-Velazquez G, Chavez R, Perez-Tapia M, Estrada-Garcia I, Estrada-Parra S, Jimenez-Martinez MC. Immunological study of patients with herpetic stromal keratitis treated with Dialyzable Leukocyte Extracts. International Congress of Immunology. Medimond s.r.l. International Proceedings, Italy; 2007, P. 67-71.
52. Santacruz-Valdes C, Aguilar G, Perez-Tapia M, Estrada-Parra S, Jimenez-Martinez MC. (2010) *Am J Case Rep* **11**, 97-101.
53. Robles-Contreras A, Vizuet L, Rivera E, Serafin-Lopez J, Estrada-Garcia I, Estrada-Parra S, *et al.* (2011) *Rev Alerg Mex.* **58**, 147-154.
54. Santacruz-Valdes C, Perez-Tapia M, Nava A, Estrada-Parra S, Jimenez-Martínez MC. Treatments of Infectious and Allergic Conjunctivitis; Is the Immunomodulation the Future?. En Common Eye Infections. InTech. Rijeka, Croatia; 2013. P. 45-60.
55. Garfias Y, Zaga-Clavellina V, Vadillo-Ortega F, Osorio M, Jiménez-Martínez MC. (2011) *Immunol Invest.* **40**, 1-14.
56. Barequet IS, Habot-Wilner Z, Keller N, Smollan G, Ziv H, Belkin M, Rosner M. (2008) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **49**, 163-167.

### **Semblanza de la Dra. María del Carmen Jiménez Martínez**



Médica Cirujana y Doctorada en Ciencias en la especialidad de Inmunología por la Facultad de Medicina de la UNAM. Forma parte del Sistema Nacional de Investigadores y de la Red de Desarrollo de Fármacos y Métodos Diagnósticos (Red Farmed) de CONACYT. Actualmente es profesora titular "A" MT en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM y Coordinadora de la Unidad de Investigación en el Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana". En los últimos años ha colaborado como investigadora responsable de diversos desarrollos farmacéuticos, contando con tres registros de patente; al día de hoy participa como colaboradora externa de la Unidad de Investigación, Desarrollo en Innovación Médica y Biotecnológica (UDIMEB) (antes Proyecto Factor de Transferencia). Su trabajo experimental ha sido presentado en varios foros académicos y de investigación, tanto nacionales como internacionales, recibiendo diversos reconocimientos por su calidad científica. Es autora de más de 60 publicaciones enfocadas al área de la Inmunología y sus trabajos han merecido más de 200 citas por pares internacionales.

En cuanto a la docencia, la Dra. Jiménez ha sido profesora de numerosos cursos de licenciatura en la carrera de Médico Cirujano, entre los que se encuentran: Biología Celular y Tisular, Introducción a la Medicina Personalizada y desde hace más de 15 años es profesora de Inmunología, recibiendo en el año 2014 el Reconocimiento al Mérito Docente de Excelencia "Doctor José Laguna García". De 2007-2012 se desempeñó como Consejera Técnica representante de Profesores de Inmunología en la Facultad de Medicina de la UNAM. En posgrado, es profesora titular de cursos obligatorios y optativos entre los que destacan: Metodología de la Investigación y Avances recientes en inmunología diagnóstica. Actualmente es profesora y tutora acreditada en diversos programas de posgrado, graduando a la fecha un total de 28 alumnos de todos los niveles formativos: doctorado, maestría, alta especialidad, especialidad y licenciatura.



Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 81-100, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## **PATOGÉNESIS MOLECULAR DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO ASOCIADO A PAPILOMAVIRUS HUMANO**

### **Molecular pathogenesis of cervical cancer associate to human papillomavirus**

Gutiérrez-Xicotencatl Lourdes<sup>1\*</sup>, Pedroza-Saavedra Adolfo<sup>1</sup>, Chihu-Amparán Lilia<sup>1</sup>, Maldonado-Gama M<sup>1</sup>, Salazar-Piña DA<sup>1</sup>, Anaya-García A<sup>1</sup>, Esquivel-Guadarrama Fernando<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos. \* [mlxico@insp.mx](mailto:mlxico@insp.mx) Tel: (777) 329-30-86

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos.

### **RESUMEN**

El principal agente etiológico asociado al cáncer cérvico uterino es el papilomavirus humano, siendo los de tipo 16 y 18 los de más alto riesgo para este tipo de cáncer. El papilomavirus humano es un virus de DNA de la familia *Papillomaviridae*. El mecanismo por el cual los papilomavirus humanos inducen la transformación celular es a través de los oncogenes *E6*, *E7* y *E5*, que codifican para oncoproteínas capaces de alterar el ciclo celular y la apoptosis mediante la modulación de señales celulares que favorecen la persistencia viral, y a largo plazo promueven la transformación celular.

E7 es una oncoproteína de 98 aminoácidos, con un dominio en el N-terminal que contiene los sitios de fosforilación para CKII y el sitio de unión a pRb involucrado en la separación del complejo E2F/pRb. Diversos estudios han demostrado que E7 presenta diferentes isoformas y localizaciones celulares (citoplasma y núcleo). Es posible que la fosforilación esté involucrada en estas variaciones. Recientemente, nuestro grupo de trabajo mostró en células CasKi, la presencia de 3 isoformas de E7 de papilomavirus humano tipo16, E7a1 (17.5 kDa, pI 4.68), E7a (17 kDa, pI 6.18) and E7b (16 kDa, pI 6.96), y utilizando inmunofluorescencia se demostró que E7 está presente en retículo endoplásmico, aparato de Golgi y núcleo, lo que sugiere que E7 podría estar presentando modificaciones postraduccionales.

En contraste, la oncoproteína E5 es capaz de incrementar la vida media del receptor al factor de crecimiento epidérmico, lo que sugiere que E5 tiene un papel preponderante durante el ciclo viral y en las etapas tempranas de la neoplasia. Recientemente, nuestro grupo demostró que E5 coadyuva en la ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico para reducir los niveles de p27<sup>Kip1</sup> e incrementar la fase S, permitiendo que las células entren rápidamente al ciclo celular (posiblemente un mecanismo de la actividad oncogénica de E5). Esto permite que el papilomavirus humano se establezca en la célula, y exprese E6 y E7, generando la transformación celular.

**Palabras clave:** Papilomavirus humano, E7, E5, oncoproteínas, cáncer cérvico uterino.

### ABSTRACT

The main etiological agent associated to cervical cancer is the human papillomavirus (HPV), being the high-risk types 16 and 18 the most frequently present in this cancer. The HPV is a DNA virus that belongs to the newly named *Papillomaviridae* family. The mechanisms by which HPVs induce cell transformation is through the oncogenes *E6*, *E7* and *E5* that codify for oncoproteins that have developed strategies to alter the cell cycle and apoptosis through targeting different cellular pathways, favoring viral persistence and promoting cellular transformation.

The E7 is a small 98 amino acids oncoprotein, with a NH-terminal domain that contains the CKII phosphorylation sites and the pRb binding site involved in the disruption of the E2F/pRb1 complex. The E7 oncoprotein shows different molecular weights and cellular localizations (cytoplasmic and nucleus), and

phosphorylation may explain some of these variations. Recently, our group identified three isoforms of E7 from HPV16 present in CasKi cells, E7a1 (17.5 kDa and pI 4.68), E7a (17 kDa and pI 6.18) and E7b (16 kDa and pI 6.96), and by immunofluorescence showed that E7 is present in ER, Golgi and nucleus. This suggests that during the processing and transit of E7 through the different cell compartments, the protein could be post-translationally modified.

In contrast, the E5 oncoprotein is capable of increase the half-life of growth factor receptors, which suggest that E5 has a key role in viral life cycle and important in the early development of the neoplasia. Recently, we showed that E5 synergizes with EGF-receptor signaling pathway to down-regulate the p27<sup>Kip1</sup> protein levels and increase the S-phase allowing the cells to enter faster into the cell cycle (possibly a mechanism of E5 oncogenic activity) and preparing the suitable conditions for HPV establishment in the cell and the expression of the mayor oncoproteins E6 and E7.

**Keywords:** Human papillomavirus, E7, E5, oncoproteins, cervical cancer.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) en la actualidad representa un problema de salud pública en nuestro país y en el mundo, por lo que se hace necesario identificar el o los mecanismos que permitan controlar el proceso canceroso producido por el virus de papilomavirus humano (HPV), principal agente etiológico de la enfermedad. El conocimiento de cómo actúan estas proteínas oncogénicas puede ser una herramienta importante que nos ayude a identificar las vías a través de las cuales se puede controlar esta enfermedad. Por lo que, la caracterización de las oncoproteínas virales E7 y E5 así como de sus proteínas blanco es de relevancia para poder coadyuvar al entendimiento del proceso de transformación celular generado por HPV.

El HPV es un virus de DNA que pertenece a la familia *Papillomaviridae* [1], e induce una variedad de lesiones en la piel y en las mucosas. Aproximadamente, la mitad de los más de 200 tipos de HPV pueden infectar la mucosa genital generando lesiones benignas. Sin embargo, un subgrupo de estos virus es identificado en más del 98% de los carcinomas malignos del tracto genital, la mayoría de los cuales presentan los tipos 16 y 18 considerados de alto riesgo, por su capacidad de generar progresión hacia cáncer cérvico uterino [2,3].

Los mecanismos a través de los cuales HPV induce transformación celular han sido investigados desde hace más de 20 años, y se ha observado que los transcritos virales más abundantes en los tumores y en líneas celulares de tumores son producidos a partir de los marcos de lectura de *E6* y *E7*, que son los conocidos como oncogénicos. Estos dos genes de HPV son necesarios y suficientes para inducir transformación de células murinas, transformar fibroblastos humanos y en cooperación con *ras* son capaces de transformar células de riñón de embrión de rata y queratinocitos humanos primarios [4-7]. Se ha demostrado que *E6* y *E7* de HPV de alto riesgo tienen la habilidad de alterar señales involucradas en el control del ciclo celular, interaccionando y neutralizando la función de los genes supresores, p53 y pRb, respectivamente [8, 9]; lo que genera inestabilidad genómica y la acumulación de mutaciones que pueden contribuir al proceso de transformación. Sin embargo, existen otras proteínas blanco de las oncoproteínas *E6* y *E7*, que posiblemente también participan en el proceso oncogénico. Más recientemente, se identificó a *E5* de HPV16 como otra oncoproteína, la cual es capaz de incrementar la vida media del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) y del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) [10]. Se ha observado, que el oncogén *E5* se pierde en los estadios tardíos del CaCU, debido a la integración del genoma viral al celular. Sin embargo, la asociación que presenta *E5* con los receptores a factores de crecimiento, sugieren que puede tener un papel importante durante el ciclo viral y posiblemente durante estadios tempranos de la enfermedad.

Los oncogenes de HPV han desarrollado diversas estrategias para alterar el ciclo celular y la apoptosis a través de controlar diferentes señales celulares, lo que permite la persistencia viral, promoviendo la transformación celular (Tabla1).

### **Propiedades bioquímicas y función de la oncoproteína E5 de HPV.**

La oncoproteína *E5* es una pequeña proteína hidrofóbica importante en el proceso de carcinogénesis, con potencial oncogénico, aunque su papel en este proceso aún no está bien determinado [11]. Las proteínas *E5* de los papilomavirus animal y humano son capaces de transformar células de mamífero con diferentes grados de eficiencia [11-13]. La proteína *E5* de BPV-1 (bovine papilomavirus tipo1) y HPV son proteínas transmembranales localizadas en el aparato de Golgi y endosomas, pero también han sido identificadas en membrana plasmática y retículo endoplásmico (ER) [14-17]. *E5* de HPV16 es una oncoproteína de 83 aminoácidos (aa), con un peso molecular estimado de 10 kDa.

Tabla I. Caminos de señalización de las proteínas blanco de la oncoproteína E7 de HPV.

Vía de señalización	Proteína Blanco de E7	Actividad	Referencia
Metabolismo	$\alpha$ -glicosidasa	Actividad catalítica	Zwershke et al., 1999
Represor transcripcional	E2F6	Desregulación	McLaughlin-Drubin et al., 2008
Metástasis	Inhibiendo Nm23-H1 y Nm23-H1	Desregulación de ciclo celular y diferenciación	Mileo et al., 2006
Factores transcripcionales	Familia AP-1 (incluidas c-Jun, JunB, JunD y c-Fos)	Inducción de transformación celular	Antimore et al., 1996
	MPP2	Co-transformación con Ras	Lüscher-Firzloff et al., 1999
	Proteínas SMAD	Supresión de mediadores de SMAD, carcinogénesis	Lee DK et al., 2002
	ISGF3	Pérdida de formación del complejo de transcripción interferón	Barnard & McMillan, 1999
Modificación DNA	BRG-1 (SWI/SNF)	Desregulación del control de ciclo celular	Lee D. et al., 2002
Anti-apoptótico	Mcl-1	Progresión tumoral	ChengYW et al., 2008
Relación con histonas	Mi2 $\beta$ forma del complejo NURD	Control de la proliferación celular	Brehm et al., 1999

MPP2, Factor M phase phosphoprotein 2; ISGF3, Stimulated gene factor 3.

Esta proteína presenta 3 alfa-hélices transmembranales y pequeñas regiones hidrofílicas en el C- y N-terminal [18-20], siendo la primera región hidrofóbica importante en la localización celular de E5 (Fig. 1) [17,21]. En células HaCat, que son queratinocitos humanos inmortalizados, esta región confiere crecimiento independiente de sustrato y también está asociada con la capacidad de las células para invadir matriz extracelular en cultivos "raft" [17,22]. De la misma forma, se ha demostrado que la proteína E5 contribuye a la transformación celular a través de incrementar la señal mitogénica que va de los receptores a factores de crecimiento hacia el núcleo [10].

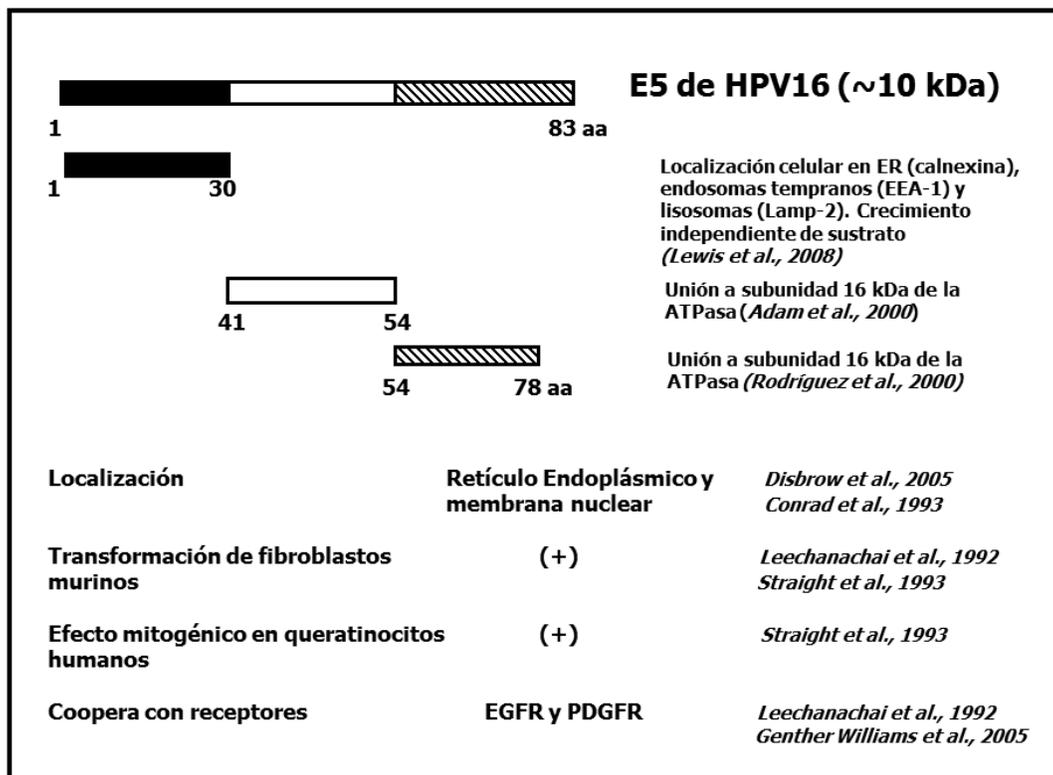


Figura 1. Características bioquímicas de la oncoproteína E5. La proteína E5 de 83 aa presenta un peso molecular estimado de 10 kDa. La oncoproteína E5 se divide en 3 regiones hidrofóbicas. La primera región (aa 1-30) es importante para localización en membrana y crecimiento independiente de sustrato. La segunda (aa 41-54) y la tercera región hidrofóbica (aa 54-78) contienen los dominios de importancia para unión a la subunidad de 16 kDa de H<sup>+</sup>-ATPasa, importante en la acidificación de los endosomas.

### Actividad funcional de la oncoproteína E5

Uno de los mecanismos propuestos para la actividad transformante de E5 es a través de incrementar la vida media de receptores tirosina cinasas como el receptor para el EGF-R, el estado de fosforilación del receptor o ambos [13,23-25]. También se ha propuesto que las proteínas E5 de HPV interactúan con la subunidad de 16 kDa de la ATPasa protónica, inhibiendo la acidificación de los endosomas y retardando la degradación de los receptores [15,24,26,27]. Al mismo tiempo, E5 induce un gran número de actividades como la alcalinización del pH endocelular, activación de tirosina cinasas, deposición de melanina y modulación de la sensibilidad a drogas dopaminérgicas, como se demostró en melanocitos que expresan E5 de HPV16 [28]. El segundo y tercer dominio transmembranales están involucrados en la unión a la subunidad de la ATPasa-16

kDa (Fig. 1) [29,30]. Sin embargo, algunos estudios contradictorios indican que la proteína E5 se une pero no altera la actividad de la ATPasa protónica vacuolar [29-31], y se ha demostrado que el efecto final se debe a la perturbación del tráfico endocítico [32]. En contraste, E5 de HPV16 estimula la señal de transducción mediada por el EGFR, a través de inhibir la interacción con c-Cbl, lo que disminuye la degradación del receptor (Fig.2) [33]. Recientemente, se demostró que E5 de HPV16 modula de manera negativa al KGF-R/FGF-R2b (receptor de factor de crecimiento de queratinocitos) a través de interferir la endocitosis del receptor y perturbando el proceso de diferenciación celular [34].

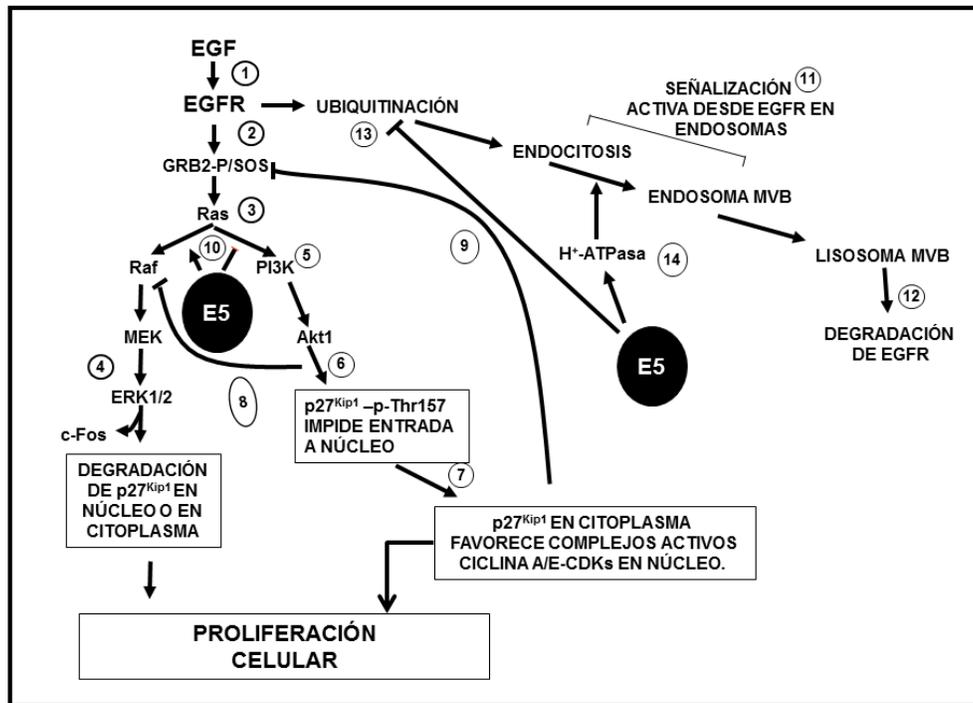


Figura 2. Modelo de actividad de la oncoproteína E5 en el entorno celular. 1) EGF se une a su receptor y activa auto-fosforilación. 2) EGFR fosforilado pasa su señal mitogénica a través del complejo GRB2/SOS hacia la cascada de Ras. La señal de Ras puede pasar por 2 vías: 4) La cascada de las MAPKs que conlleva a la degradación de p27<sup>kip1</sup>, la activación de c-Fos y c-Jun para formar el complejo transcripcional AP-1 que finalmente lleva a proliferación celular. 5) Si se activa PI3K se fosforila Akt1 regulando componentes de apoptosis. 6) Akt1 fosforila a p27<sup>kip1</sup> en Thr157 impidiendo translocación a núcleo. 7) Acumulación de p27<sup>kip1</sup> en citoplasma favorece la actividad de los complejos CycA/E-CDK2 y por ende la progresión del ciclo celular. 8) "Cross-talk" de Akt1 con Raf regula negativamente las MAPKs y retiene a ERK1/2 en citoplasma, parando la cascada de señalización a núcleo y con ello la proliferación celular. 9) Acumulación de p27<sup>kip1</sup> en citoplasma, tiene un efecto inhibitorio sobre Grb2/SOS apagando la señal de Ras por

retroalimentación negativa. 10) E5 podría estar modulando el “cross-talk” entre las cascadas de Ras-PI3K, inhibiendo esta última y favoreciendo la señalización a través de las MAPKs. 11 y 12) El EGFR se transporta a través de endosomas para su degradación final en lisosomas después de su acidificación, pero aún en este sistema es capaz de transmitir su señal. 13) En el modelo, E5 interfiere la ubiquitinación del EGFR a través de interferir su unión a c-Cbl y evitando así su degradación total con el concomitante paso de su señal. 14) Al mismo tiempo, E5 es capaz de interactuar con la subunidad de 16 kDa de H<sup>+</sup>-ATPasa, inhibiendo la acidificación de los endosomas y retardando el transporte vesicular.

La expresión de la proteína E5 ha sido asociada con la expresión de otros miembros de la familia de EGF-R (p ej. ErbB1, ErbB4), así como con la actividad de ErbB2 y componentes de la ruta de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF), como las MAP cinasas ERK1/2 [35-37]. La activación de los miembros de la familia de las MAP cinasas, posiblemente involucran la regulación de otro grupo de genes implicados en crecimiento celular, como es el caso de que E5 de HPV16 favorece la sobre expresión de factores transcripcionales, tales como c-Fos y c-Jun que conforman el complejo AP-1 [38-40], y que estimulan la transcripción de genes involucrados en crecimiento celular. Durante el ciclo celular las proteínas E5 de HPV11 y 16 son capaces de modular la proliferación celular a través de reprimir la expresión del gen *p21<sup>Waf1</sup>* por medio de la activación de *c-jun* [41]. Recientemente, se demostró que E5 de HPV16 estimula la degradación del inhibidor de CDK *p27<sup>Kip1</sup>* a través de la vía de señalización del EGF-R, lo que permite que las células permanezcan por mayor tiempo dentro del ciclo celular debido a que duran más tiempo en la fase S (Fig. 2) [42]. Sin embargo, también se ha demostrado que E5 puede funcionar de manera independiente del EGF-R a través de PLC $\gamma$ 1 [43] y de las MAP cinasas (ERK1/2 y p38), cuando las células son puestas en condiciones de estrés [44].

Por otra parte, E5 es capaz de activar otros factores transcripcionales, tales como NF- $\kappa$ B, permitiendo la expresión de COX-2 [45]; induce la expresión de EP4, del receptor de prostaglandina E2, lo que incrementa la eficiencia de formación de colonias y la secreción del factor VEGF (Vascular endothelial growth factor) en células cancerosas cervicales, ambos requeridos en el crecimiento tumoral, angiogénesis y en metástasis [46].

Otras de las actividades que realiza E5 es la de ayudar en la evasión de la respuesta inmune, la cual lleva a cabo a través de retener el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I en el aparato de Golgi, previniendo su transporte a la superficie de la célula, lo cual evita el reconocimiento de las células

infectadas, por parte de las células de la respuesta inmune. Por otra parte, HPV16 E5, no afecta la síntesis de HLA clase I, pero interfiere con TAP (transporter associated with antigen processing). La ausencia de moléculas HLA clase I en células que expresan E5, permite el establecimiento de la infección por HPV, debido a que las células infectadas no pueden ser reconocidas por células citotóxicas y “natural killer” (NK), evitando así la respuesta inmune [47-50]. En este contexto, se observó que mujeres con lesiones severas asociadas a infección por HPV16 presentaban una respuesta reducida de células T CD8+ E5 específicas, al mismo tiempo que E5 es capaz de evitar la apoptosis mediada por TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand) y FasL (Fas Ligand), como parte del mecanismo de escape de la respuesta inmune en estadios tempranos de la infección y del ciclo viral [51,52].

La asociación cercana de E5 con factores de crecimiento y sus receptores, además del hecho de que el gen *E5* se pierde en estadios tardíos de la enfermedad, sugiere que E5 pudiera jugar un papel importante en la génesis del cáncer cervical, como un iniciador del proceso de transformación celular, como sucede con la oncoproteína Ras en cáncer colorrectal [53,54].

### **Propiedades bioquímicas y función de la oncoproteína E7 de HPV**

La secuencia de nucleótidos de los oncogenes *E7* está altamente conservada entre los diferentes tipos de HPVs. El marco de lectura de *E7* codifica para una pequeña fosfoproteína ácida de 98 aa. El peso molecular calculado de E7 va de entre 11-14 kDa en condiciones de fosforilación *in vitro*. Sin embargo, la movilidad electroforética de la proteína E7 de HPV16 cuando se analiza por SDS-PAGE es aproximadamente de 17 kDa y este peso molecular no es modificado cuando la proteína es fosforilada en condiciones *in vitro* por CKII [55-57]. Heck y colaboradores en 1992 demostraron que el corrimiento electroforético anómalo de E7 de HPV16 radicaba en los residuos de aminoácidos del N-terminal que le confieren carga negativa a la proteína [58].

Las proteínas E7 de los diferentes tipos de HPVs son altamente similares entre ellas y comparten 3 regiones de homología con la proteína E1A de Adenovirus y con el antígeno largo de SV40 (Fig. 3) [59,60]. La región N-terminal de E7 contiene la región consenso CR1 (Consensus Region 1), localizada entre los aa 1-20, siendo esta CR1 importante en la síntesis de DNA viral y el proceso de transformación celular [61]. La región CR2 (aa 21-43) contiene el sitio de unión a pRB (aa 21-26), los sitios de fosforilación por CKII (aa 31 y 32) y el sitio de unión

al complejo ciclina A-E2F [59,61,62]. La región C-terminal de HPV16 E7 (aa 44-98) no tiene una alta homología con la región CR3 de la proteína E1A, pero contiene un dominio de unión a  $Zn^{+2}$  compuesto de 2 motivos C-X-X-C separados por 29 aa entre ellos (Fig. 3) [6,60]. De esta forma las proteínas E7 de HPV16 y 18 son capaces de unir  $Zn^{+2}$  a través de los motivos C-X-X-C, los cuales parecen ser importantes para la dimerización y estabilidad de las proteínas E7. Esta región también contiene un sitio de unión a pRb de baja afinidad, la cual está involucrada en la separación del complejo E2F/pRb1 [63,64].

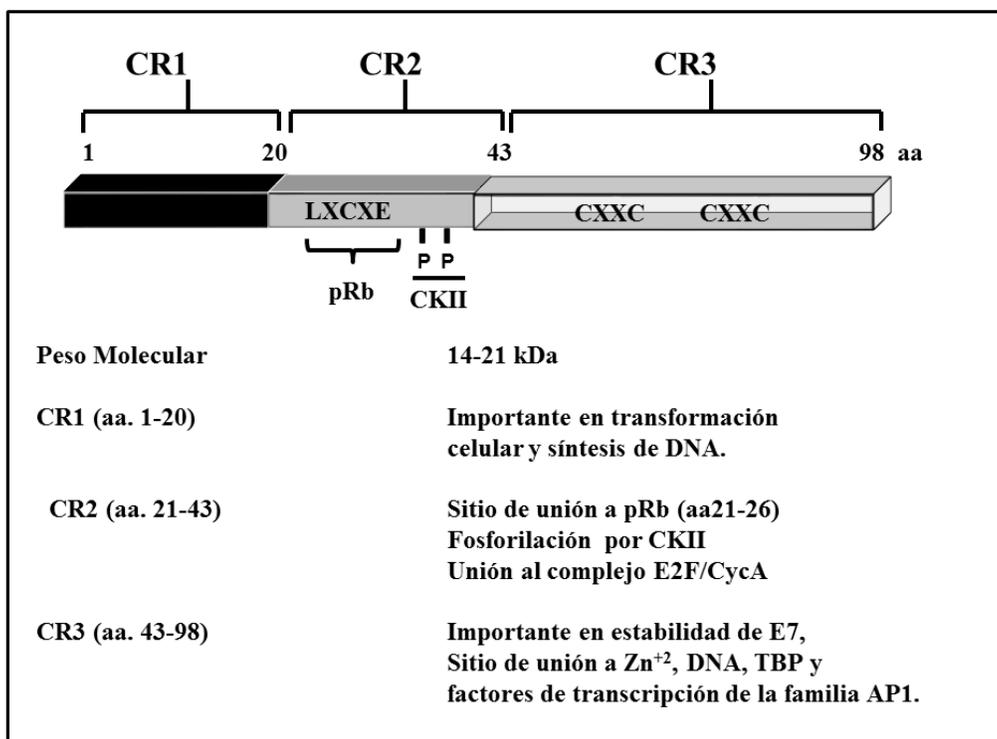


Figura 3. Características bioquímicas de la oncoproteína HPV16 E7. La oncoproteína E7 ha sido reportada con diferentes pesos moleculares (14-21 kDa), diferencias que han sido parcialmente explicadas por la carga negativa de la proteína. E7 comparte 3 regiones de homología con la proteína E1A de Adenovirus y con el antígeno T largo de SV40, demarcadas como CR1, 2 y 3. Análisis mutacional de E7 ha mostrado que CR1 es importante para la transformación celular; CR2 contiene la región de alta afinidad para unión a pRb (LXCXE) y los sitios de fosforilación por CKII (aa 31 y 32); CR3 contiene 2 sitios de unión a  $Zn^{+2}$  importantes para la estabilidad de E7 y unión a DNA.

Se han reportado diferentes pesos moleculares para la proteína E7, y se ha sugerido que la carga negativa y la región N-terminal, están involucrados en estos

cambios. Experimentos realizados por diferentes grupos reportaron la presencia de al menos 2 especies de E7 en HPV6, 16 y 18, pero no explicaron el significado biológico del origen de estas especies [55,65-67]. La fosforilación de la proteína E7, puede explicar algunas de las diferencias en los pesos moleculares reportados, sin embargo, el tratamiento de la proteína E7 con fosfatasa alcalina sugiere la presencia de otras modificaciones postraduccionales que no han sido identificadas. De la misma manera, el reporte de diferentes sitios de localización celular de E7 por diferentes grupos de investigación en citoplasma, núcleo, ER y aparato de Golgi, sugiere también la presencia de modificaciones que pudieran estar afectando la localización así como la interacción con las diferentes proteínas blanco [66-69].

La proteína E7 es capaz de translocarse a núcleo a través de una vía no clásica independiente de la proteína Ran y de los receptores de importación beta-Kap. Adicionalmente, E7 posee 2 señales NLS (nuclear localization signal) y una señal NES (nuclear exportation señal), lo que le permite transitar entre el núcleo y el citoplasma [70,71], y posiblemente estaría sujeto a las modificaciones postraduccionales, así como a la interacción que tenga esta proteína con sus proteínas blanco en cada compartimiento celular. Recientemente, se identificaron 3 isoformas de HPV16 E7 en células CasKi, las cuales se denominan E7a1 (17.5 kDa; pI 4.68), E7a (17 kDa; pI 6.18) y E7b (16 kDa; pI 6.96). El procesamiento de la proteína E7 fue seguido por medio de experimentos de pulso y caza, en donde se demostró que la primera isoforma que se sintetiza es la proteína E7a, y después de aproximadamente 1 hora ésta es procesada a una forma de corrimiento electroforético más rápido, que es la E7b con una vida media corta de sólo 70 min. También fue identificada una banda de 17.5 kDa (E7a1), la cual se sugiere es la isoforma E7a que debido a fosforilación, cambia su carga y se retarda su corrimiento electroforético. Por otra parte, la banda de 16 kDa, es posible que sufra una modificación postraduccional diferente a la fosforilación, pero aún no ha sido identificada [69]. Lo anterior sugiere que durante su procesamiento, la proteína E7 pudiera estar sufriendo diferentes modificaciones postraduccionales, lo que le confiere las diferentes características bioquímicas y le permite transitar a través de los diferentes compartimientos celulares en donde se le ha identificado.

De acuerdo con la secuencia de aa de la proteína HPV16 E7, ésta contiene sitios putativos de modificaciones postraduccionales, tales como la Asn 29 que pudiera ser glicosilada; sulfatación en las Tyr 23 y 25, o fosforilación en 5 residuos



modificar múltiples caminos para regular la proliferación celular [62,72]. Diversos estudios han demostrado que las proteínas E7 de HPVs de alto riesgo, son capaces de desregular el ciclo celular principalmente por unirse y degradar a la proteína pRb, lo que resulta en la disociación del complejo E2F/pRb, permitiendo la entrada a la fase S y así la progresión del ciclo celular [73,74]. Esta actividad de E7 se encuentra asociada al motivo LXCXE y a la región CR3 de unión a  $Zn^{+2}$ , sin embargo, se ha identificado que E7 puede activar a E2F a través de un camino independiente de pRB, a través de interactuar directamente con el complejo E2F/CycA [75,76]. También se ha demostrado que E7 se une y activa a  $\mu$ -calpaina que a su vez marca a pRb para ubiquitinación y degradación por cullin-2 a través del proteosoma [77,78].

De la misma manera se ha observado que E7 afecta a la familia de proteínas relacionadas a pRb, como son p107, p130 y al factor asociado a retinoblastoma p600 [79-81]. Sin embargo, las células tratan de defenderse de la infección por HPV a través de la expresión de otras moléculas, como es el caso de la transglutaminasa 2 que inhibe la unión de HPV18 E7 a pRb por medio de la incorporación de poliamina y PAI-2, así como también por la regulación de la expresión de la proteína ARF, que protege a pRb de la acelerada degradación ocasionada por E7 [82,83].

Por otra parte, la oncoproteína E7 es capaz de modular la fase G2/M del ciclo celular regulando la actividad de la cinasa de la histona H1 a través de un complejo con p107, lo que permite la progresión del ciclo viral [79]. También se ha demostrado que HPV16 E7 es capaz de asociarse a los complejos E2F/CycA o CycE retardando la actividad cinasa de CDK2 o bien inhibiendo la actividad de los inhibidores de CDKs como  $p21^{Waf1}$ ,  $p27^{Kip1}$  y de manera indirecta  $p16^{Ink4a}$ , lo que posiblemente pudiera estar activando un subgrupo de proteínas importantes para completar el ciclo viral [84-89]. Además de estas interacciones descritas, existen otras proteínas blanco de E7, las cuales modifican diferentes vías de señalización que afectan el metabolismo, metástasis, transcripción y apoptosis entre otros, (Tabla I) [90-97].

En relación a la evasión de la respuesta inmune, E7 es capaz de interferir con la vía de señalización de citosinas como la evasión de la inmuno-vigilancia cuando se une a IRF-1, lo que previene la activación de los promotores de los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  [96,98]; así como también es capaz de reprimir el promotor de TGF- $\beta$ 2 a través de la liberación de E2F de pRb [94,99]. Finalmente, E7 también

evade la respuesta citotóxica contra HPV, reduciendo los niveles de TAP-1, lo cual genera la reducción de la presentación de antígenos por MHC-I, evitando una respuesta citotóxica específica [100].

### Conclusiones.

Diversos grupos de investigadores han trabajado intensamente para tratar de dilucidar el o los mecanismos moleculares a través de los cuales los oncogenes virales *E5* y *E7* llevan a cabo la transformación celular. Al mismo tiempo se ha hecho claro que las oncoproteínas virales, usan y modifican diferentes vías de señalización, especialmente aquellas relacionadas con proliferación y diferenciación celular, y la apoptosis. Adicionalmente, la dependencia del ciclo viral de HPV en el proceso de diferenciación celular, ha hecho difícil el estudio de este proceso y la manera de cómo funcionan las proteínas virales en su conjunto en el entorno celular. El desarrollo reciente de los cultivos “raft” y “xenographs”, que permiten diferenciación celular, han permitido la replicación de HPV en condiciones *in vitro*. Es por ello, que actualmente será de gran importancia determinar las características bioquímicas, así como la actividad biológica de las proteínas virales en este contexto fisiológico con genomas virales completos y no en sistemas de sobre expresión como se ha manejado recientemente. De esta manera, el estudio de los mecanismos de transformación celular asociados a HPV han permitido la identificación de algunas de las proteínas blanco, que pudieran ser consideradas para el diseño de drogas que en el futuro serán empleadas específicamente para el tratamiento de cánceres asociados a HPV.

### Referencias

1. de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., et al. (2004). *Virology*.**324**, 17-27
2. Lorincz, A. T., Reid, R., Jenson, A. B., et al. (1992). *Obstetrics and gynecology*.**79**, 328-337
3. Shah, K. V., and Buscema, J. (1988). *Annual review of medicine*.**39**, 371-379
4. Yasumoto, S., Burkhardt, A. L., Doniger, J., and DiPaolo, J. A. (1986). *Journal of virology*.**57**, 572-577
5. Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., et al. (1987). *Journal of virology*.**61**, 1061-1066
6. Phelps, W. C., Yee, C. L., Munger, K., and Howley, P. M. (1988). *Cell*.**53**, 539-547
7. Yoshida, S., Kajitani, N., Satsuka, A., et al. (2008). *Journal of virology*.**82**, 8820-8827
8. Dyson, N., Guida, P., Munger, K., and Harlow, E. (1992). *Journal of virology*.**66**, 6893-6902

9. Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). *Science*.**248**, 76-79
10. Leechanachai, P., Banks, L., Moreau, F., and Matlashewski, G. (1992). *Oncogene*.**7**, 19-25
11. Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z. M., et al. (1994). *Virology*.**203**, 73-80
12. Horwitz, B. H., Settleman, J., Prakash, S. S., and DiMaio, D. (1989). *Current topics in microbiology and immunology*.**144**, 143-151
13. Straight, S. W., Hinkle, P. M., Jewers, R. J., and McCance, D. J. (1993). *Journal of virology*.**67**, 4521-4532
14. Cartin, W., and Alonso, A. (2003). *Virology*.**314**, 572-579
15. Conrad, M., Bubb, V. J., and Schlegel, R. (1993). *Journal of virology*.**67**, 6170-6178
16. Disbrow, G. L., Hanover, J. A., and Schlegel, R. (2005). *Journal of virology*.**79**, 5839-5846
17. Lewis, C., Baro, M. F., Marques, M., et al. (2008). *Virology journal*.**5**, 30
18. Alonso, A., and Reed, J. (2002). *Biochimica et biophysica acta*.**1601**, 9-18
19. Ullman, C. G., Haris, P. I., Kell, B., et al. (1994) H. *Biochemical Society transactions*.**22**, 439S
20. Yang, D. H., Wildeman, A. G., and Sharom, F. J. (2003). *Protein expression and purification*.**30**, 1-10
21. Cortese, M. S., Ashrafi, G. H., and Campo, M. S. (2010). *International journal of cancer. Journal international du cancer*.**126**, 1675-1682
22. Barbaresi, S., Cortese, M. S., Quinn, et al. (2010). *The Journal of general virology*.**91**, 521-530
23. Genther Williams, S. M., Disbrow, G. L., Schlegel, R., et al. (2005). *Cancer research*.**65**, 6534-6542
24. Straight, S. W., Herman, B., and McCance, D. J. (1995). *Journal of virology*.**69**, 3185-3192
25. Tomakidi, P., Cheng, H., Kohl, A., et al. (2000). *European journal of cell biology*.**79**, 407-412
26. Andresson, T., Sparkowski, J., Goldstein, D. J., and Schlegel, R. (1995). *The Journal of biological chemistry*.**270**, 6830-6837
27. Briggs, M. W., Adam, J. L., and McCance, D. J. (2001). *Virology*.**280**, 169-175
28. Di Domenico, F., Foppoli, C., Blarzino, C., et al. (2009). *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*.**28**, 4
29. Adam, J. L., Briggs, M. W., and McCance, D. J. (2000). *Virology*.**272**, 315-325
30. Rodriguez, M. I., Finbow, M. E., and Alonso, A. (2000). *Oncogene*.**19**, 3727-3732
31. Ashby, A. D., Meagher, L., Campo, M. S., and Finbow, M. E. (2001). *The Journal of general virology*.**82**, 2353-2362
32. Chen, S. L., Tsai, T. Z., Han, C. P., and Tsao, Y. P. (1996). *Journal of virology*.**70**, 3502-3508

33. Zhang, B., Srirangam, A., Potter, D. A., and Roman, A. (2005). *Oncogene*.**24**, 2585-2588
34. Belleudi, F., Leone, L., Purpura, V., et al. (2011). *Oncogene*.**30**, 4963-4976
35. Crusius, K., Auvinen, E., and Alonso, A. (1997). *Oncogene*.**15**, 1437-1444
36. Crusius, K., Auvinen, E., Steuer, B., et al. (1998). *Experimental cell research*.**241**, 76-83
37. Kim, S. H., Juhnn, Y. S., Kang, S., et al. (2006). *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.**63**, 930-938
38. Chen, S. L., Tsao, Y. P., Yang, C. M., et al. (1995). *The Journal of general virology*.**76 ( Pt 11)**, 2653-2659
39. Chen, S. L., Huang, C. H., Tsai, T. C., et al. (1996). *Archives of virology*.**141**, 791-800
40. Chen, S. L., Lin, Y. K., Li, L. Y., et al. (1996). *Journal of virology*.**70**, 8558-8563
41. Tsao, Y. P., Li, L. Y., Tsai, T. C., and Chen, S. L. (1996). *Journal of virology*.**70**, 7535-7539
42. Pedroza-Saavedra, A., Lam, E. W., Esquivel-Guadarrama, F., and Gutierrez-Xicotencatl, L. (2010) *T. Virology*.**400**, 44-52
43. Crusius, K., Kaszkin, M., Kinzel, V., and Alonso, A. (1999). *Oncogene***18**, 6714-6718
44. Crusius, K., Rodriguez, I., and Alonso, A. (2000) . *Virus genes*.**20**, 65-69
45. Kim, S. H., Oh, J. M., No, J. H., et. al. (2009). *Carcinogenesis*.**30**, 753-757
46. Oh, J. M., Kim, S. H., Lee, Y. I., et al. (2009). *Carcinogenesis*.**30**, 141-149
47. Araibi, E. H., Marchetti, B., Ashrafi, G. H., and Campo, M. S. (2004). *The Journal of general virology*.**85**, 2809-2814
48. Ashrafi, G. H., Haghshenas, M. R., Marchetti, B., et al. (2005). *International journal of cancer. Journal international du cancer*.**113**, 276-283
49. Marchetti, B., Ashrafi, G. H., Dornan, E. S., et al. (2006). *Oncogene*.**25**, 2254-2263
50. Marchetti, B., Ashrafi, G. H., Tsirimonaki, E., et al. (2002). *Oncogene*.**21**, 7808-7816
51. Gill, D. K., Bible, J. M., Biswas, C., et al. (1998). *The Journal of general virology*.**79 ( Pt 8)**, 1971-1976
52. Kabsch, K., Mossadegh, N., Kohl, A., et al. (2004). *Intervirology*.**47**, 48-56
53. Gryfe, R., Swallow, C., Bapat, B., et al. (1997). *Current problems in cancer*.**21**, 233-300
54. Takami, K., Yana, I., Kurahashi, H., and Nishisho, I. (1995). *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*.**26 Suppl 1**, 190-196
55. Gage, J. R., Meyers, C., and Wettstein, F. O. (1990). *Journal of virology*.**64**, 723-730
56. Armstrong, D. J., and Roman, A. (1992). *The Journal of general virology*.**73 ( Pt 5)**, 1275-1279
57. Armstrong, D. J., and Roman, A. (1993). *Biochemical and biophysical research communications*.**192**, 1380-1387

58. Heck, D. V., Yee, C. L., Howley, P. M., and Munger, K. (1992). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.**89**, 4442-4446
59. Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., et al. (1990). *The EMBO journal*.**9**, 153-160
60. Brokaw, J. L., Yee, C. L., and Munger, K. (1994). *Virology*.**205**, 603-607
61. Gulliver, G. A., Herber, R. L., Liem, A., and Lambert, P. F. (1997). *Journal of virology*.**71**, 5905-5914
62. Munger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., et al. (1989). *Journal of virology*.**63**, 4417-4421
63. Clemens, K. E., Brent, R., Gyuris, J., and Munger, K. (1995). *Virology*.**214**, 289-293
64. Braspenning, J., Marchini, A., Albarani, V., et al. (1998). *Oncogene*.**16**, 1085-1089
65. Greenfield, I., Nickerson, J., Penman, S., and Stanley, M. (1991). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.**88**, 11217-11221
66. Sato, H., Watanabe, S., Furuno, A., and Yoshiike, K. (1989). *Virology*.**170**, 311-315
67. Selvey, L. A., Dunn, L. A., Tindle, R. W., et al. (1994). *The Journal of general virology*.**75 ( Pt 7)**, 1647-1653
68. Kanda, T., Zanma, S., Watanabe, S., et al. (1991). *Virology*.**182**, 723-731
69. Valdovinos-Torres, H., Orozco-Morales, M., Pedroza-Saavedra, A., et al. (2008). *The open virology journal*.**2**, 15-23
70. Angeline, M., Merle, E., and Moroianu, J. (2003). *Virology*.**317**, 13-23
71. Knapp, A. A., McManus, P. M., Bockstall, K., and Moroianu, J. (2009). *Virology*.**383**, 60-68
72. Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., et al. (1989). *The EMBO journal*.**8**, 3905-3910
73. Caldeira, S., Dong, W., and Tommasino, M. (2005). *Methods in molecular medicine*.**119**, 363-379
74. Collins, A. S., Nakahara, T., Do, A., and Lambert, P. F. (2005). *Journal of virology*.**79**, 14769-14780
75. Hwang, S. G., Lee, D., Kim, J., Seo, T., and Choe, J. (2002). *The Journal of biological chemistry*.**277**, 2923-2930
76. Singh, M., Krajewski, M., Mikolajka, A., and Holak, T. A. (2005). *The Journal of biological chemistry*.**280**, 37868-37876
77. Darnell, G. A., Schroder, W. A., Antalis, T. M., et al. (2007). *The Journal of biological chemistry*.**282**, 37492-37500
78. Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., et al. (2007). *Journal of virology*.**81**, 9737-9747
79. Davies, R., Hicks, R., Crook, T., Morris, J., and Vousden, K. (1993). *Journal of virology*.**67**, 2521-2528

80. Huh, K. W., DeMasi, J., Ogawa, H., et al. (2005). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.**102**, 11492-11497
81. Zhang, B., Chen, W., and Roman, A. (2006). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.**103**, 437-442
82. Darnell, G. A., Antalis, T. M., Johnstone, R. W., et al. (2003). *Molecular and cellular biology*.**23**, 6520-6532
83. Jeon, J. H., Choi, K. H., Cho, S. Y., et al. (2003). *The EMBO journal*.**22**, 5273-5282
84. Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., et al. (1996). *Oncogene*.**13**, 2323-2330
85. Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., et al. (1997). *Genes & development*.**11**, 2090-2100
86. Jones, D. L., Alani, R. M., and Munger, K. (1997). *Genes & development*.**11**, 2101-2111
87. Giarre, M., Caldeira, S., Malanchi, I., et al. (2001). *Journal of virology*.**75**, 4705-4712
88. He, W., Staples, D., Smith, C., and Fisher, C. (2003). *Journal of virology*.**77**, 10566-10574
89. Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., et al. (2010). *Virus genes*.**40**, 1-13
90. Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., et al. (1996). *The EMBO journal*.**15**, 1950-1960
91. McLaughlin-Drubin, M. E., Huh, K. W., and Munger, K. (2008). *Journal of virology*.**82**, 8695-8705
92. Mileo, A. M., Piombino, E., Severino, A., et al. (2006). *Journal of bioenergetics and biomembranes*.**38**, 215-225
93. Luscher-Firzlaff, J. M., Westendorf, J. M., Zwicker, J., et al. (1999). *Oncogene*.**18**, 5620-5630
94. Lee, D. K., Kim, B. C., Kim, I. Y., et al. (2002). *The Journal of biological chemistry*.**277**, 38557-38564
95. Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A., et al. (1999). *The EMBO journal*.**18**, 2449-2458
96. Barnard, P., and McMillan, N. A. (1999). *Virology*.**259**, 305-313
97. Cheng, Y. W., Lee, H., Shiau, M. Y., et al. (2008). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.**14**, 4705-4712
98. Park, J. S., Kim, E. J., Kwon, H. J., et al. (2000). *The Journal of biological chemistry*.**275**, 6764-6769
99. Murvai, M., Borbely, A. A., Konya, J., et al. (2004). *Archives of virology*.**149**, 2379-2392
100. Vambutas, A., DeVoti, J., Pinn, W., Steinberg, B. M., and Bonagura, V. R. (2001). *Clinical immunology*.**101**, 94-99

## **Semblanza de la Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl**



Licenciatura en Biología (FES “Zaragoza”, UNAM, 1984), Doctorado en Biología Celular (National Institute for Medical Research, Londres, Inglaterra, 1989). Estancia Posdoctoral en el “Laboratory of Molecular Oncology, Nat. Cancer Inst., NIH, USA (1989-1992). Investigador en Ciencias Médicas “E” (desde 2003) y Jefa del Departamento de Interacción Epidemiológica, CISEL-INSP (desde 1993). Investigador Nivel I del SNI (2015-2017). Veinticinco publicaciones internacionales con más de 900 citas y 6 Capítulos de libro, en las áreas de oncogenes celulares y cáncer; señalización celular; biología del cáncer cérvico uterino, bioquímica y biología molecular del papilomavirus humano, y su importancia en cáncer. Más de 100 presentaciones en congresos nacionales e internacionales en el área de oncogenes y transformación celular y respuesta inmune contra HPV y su uso en diagnóstico. En formación de recursos humanos ha formado a 5 estudiantes de Licenciatura, 8 de Maestría y 3 Doctorados en las áreas de Ciencias Biológicas y Biomedicina. En la parte de docencia es titular de la Unidad Didáctica de Biología Celular de la Maestría en Ciencias en Enfermedades Infecciosas. Ha sido becaria de CONACYT para estudios de doctorado y becaria en el Intercambio académico México-Inglaterra a través del programa de la Academia Mexicana de Ciencias y la Royal Society. Miembro de la Academia Mexicana de Ciencias desde 2002. Integrante del Comité de Investigación, del INSP (2012-2015). Integrante de la Comisión de Expertos de Biología de la convocatoria de Investigación Básica, CONACYT-SEP, 2012, 2013 y 2014. Evaluadora de proyectos de investigación para CONACYT, ICyT D.F., IBEROEKA y para los premios Pfizer y CANIFARMA.





Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 101-122, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## APUNTES SOBRE GENÓMICA V 2.0

### GENOMIC NOTES V 2.0

Valdés López Víctor<sup>1</sup>, Alba Lois Luisa<sup>1</sup>, Cancino Rodezno Angeles<sup>2</sup>, Escobar Sánchez Viviana<sup>1</sup>, Segal Kischinevzky Claudia<sup>1</sup> y Vilchis Peluyera Alfonso<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular y Genómica. <sup>2</sup>Taller de Biología Molecular de la Célula I y II. Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, CP 04510, México, DF.  
vvaldes@unam.mx 56-22-48-31

### RESUMEN

Desde sus inicios, el desarrollo de la genómica ha caminado paralelo al perfeccionamiento de los métodos de secuenciación y esto ha llevado a la obtención de una gran cantidad de información biológica, tanto de los genes mismos como de sus productos polipeptídicos. La exploración de los genomas nos ha permitido conocer que el número de genes es una más de las características de un organismo y que lo verdaderamente relevante es tanto su expresión diferencial, como la serie de interacciones que estos genes llevan a cabo, espacial y temporalmente. Asimismo, uno de los productos génicos principales, las proteínas, no sólo han sido objeto de análisis a nivel de estructura y de secuencia, sino que esta información ha servido para tener una perspectiva evolutiva, sin la cual no entenderíamos plenamente su origen y función. Por su parte, el impulso de la epigenómica nos está permitiendo comenzar a entender la dinámica del

genoma durante la vida de un organismo, lo cual sienta las bases para postular una nueva disciplina: la genómica del desarrollo.

**Palabras clave:** Genoma, secuenciación, organización genómica, universo de secuencias, epigenómica.

### **ABSTRACT**

From its earliest beginnings, the development of genomics has run parallel to the improvements in sequencing methods, generating large amounts of biological information, of genes themselves as well as their polypeptide products. The study of genomes has led us to realize that the number of genes is just one more feature of an organism, and that gene differential expression as well as the series of spatial and temporal interactions in which these genes and their products participate, are what is truly relevant. Furthermore, as the major gene products, proteins have not only been subjected to sequence and structural analyses, but also, to fully understand their origins and function, have been examined from an evolutionary perspective. Finally, the new field of epigenomics is starting to shed light on the understanding of genome dynamics across an organisms' life, which provides the basis for a new discipline: developmental genomics.

**Keywords:** Genome sequencing, genomic organization, sequence universe, epigenomics.

### **La evolución de los métodos de secuenciación**

La era genómica inició en 1975 con los métodos de secuenciación desarrollados por Sanger y colaboradores, con los que dos años más tarde se obtuvo la primera secuencia completa de un genoma, la del bacteriófago  $\phi$ -X174 de 5,375 pares de bases [1]. Durante la última cuarta parte del siglo XX, se compaginaron etapas de automatización del método de Sanger, con los retos específicos de los proyectos de secuenciación de organismos modelo. En 1995 se hicieron públicos los primeros genomas de procariontes: el de la bacteria de vida libre *Hemophilus influenzae* de 1.8 Mb (Mega pares de bases – un millón de pares de bases) y el genoma bacteriano más pequeño, de 0.58 Mb, del parásito *Mycoplasma genitalium*. Para el siguiente año se publicaron el primer genoma de una arquea de 1.7 Mb perteneciente a *Methanococcus jannaschii* y el primer genoma de un eucarionte, *Saccharomyces cerevisiae* de 12 Mb. La secuencia de 4.6 Mb del organismo modelo *Escherichia coli* K12 se completó en 1997 y en 1998 se obtuvo el primer genoma de un organismo multicelular, el de *Caenorhabditis elegans* de 100 Mb. En el año 2000 se publicaron dos genomas más de

organismos modelo de 165 y 157 Mb respectivamente, la mosca *Drosophila melanogaster* y la planta *Arabidopsis thaliana*. Gracias a estos avances tecnológicos fue posible obtener y hacer público, diez años después de iniciar el proyecto, el primer borrador de la secuencia del genoma humano de aproximadamente 3,200 Mb en el 2001. Al año siguiente se obtuvo el genoma del primer mamífero con el que se comparó el humano, *Mus musculus*, de 2,500 Mb.

Casi treinta años después de la publicación del primer genoma completo, los avances en nanotecnología hicieron posible la comercialización de los secuenciadores denominados segunda generación (NGS, *Next Generation Sequencing*), con los que es posible obtener desde miles hasta millones de secuencias cortas simultáneamente en cuestión de horas, a partir de pequeñas cantidades de material genético, ya que no dependen de las etapas de clonación que son limitantes en los métodos de primera generación. Los tipos de reacción de secuenciación más comunes en los equipos de segunda generación son la pirosecuenciación y una modificación al método de Sanger con terminadores reversibles.

La cantidad de genomas secuenciados aumenta exponencialmente a la par de una disminución en los costos de secuenciación. De acuerdo a las estimaciones del *National Human Genome Research Institute* (NHGRI), en julio de 2014 secuenciar el genoma humano costaba 4,905 dólares, es decir, casi 20,000 veces menos que lo que costó obtenerlo en septiembre de 2001. Este aumento acelerado en la obtención de secuencias impone nuevos retos informáticos que van desde el almacenamiento e integración de bases de datos con la información generada, hasta el análisis y acceso a la misma. Un esfuerzo importante de recopilación de información sobre el estatus de proyectos de secuenciación de genomas y metagenomas a nivel mundial es la base de datos GOLD (*Genomes OnLine Database*), que en su quinta versión reporta 6,649 genomas completamente secuenciados, 23,552 borradores permanentes (ya no continúan con el trabajo curatorial detallado) y 26,573 proyectos en proceso [2].

La secuenciación con tecnologías de nueva generación permite analizar con facilidad muestras que contengan mezclas de ácidos nucleicos de diferentes especies, es decir metagenomas, en los se pueden identificar organismos no cultivables en el laboratorio y estudiar la composición de comunidades ecológicas. Aunque la cantidad de genomas secuenciados a la fecha puede ser considerada como excesiva, es minúscula comparada con el tamaño de la diversidad biológica.

La obtención de un mayor número de secuencias contribuye al conocimiento de las especies, al establecimiento de los límites entre especies que siguen siendo controvertidos, al estudio de su distribución en los ecosistemas y a su conservación. Existen esfuerzos internacionales para la generación de estándares para la identificación de especies como los llamados "códigos de barras de DNA" (*DNA barcodes*) que son secuencias de regiones cortas de DNA de uno o más genes que una vez obtenidas permiten ubicar al individuo secuenciado en un árbol filogenético. Las ventajas de este método de identificación son que una vez conocida una buena parte de la diversidad, se podrán generar estándares más específicos a los taxa en estudio y secuenciar únicamente la región de interés; adicionalmente se podrán identificar nuevas especies y diseñar proyectos que sigan contribuyendo a la construcción del árbol de la vida.

La secuencia de su genoma es apenas un primer paso para estudiar la evolución y la función de los elementos genéticos de un organismo, un nivel más profundo de estudio es la secuenciación del transcriptoma, que permite comparar diferencias en la expresión génica entre células de diferentes tejidos o diferentes etapas del desarrollo de un organismo, entre células enfermas y células sanas o tratadas con fármacos, entre otras. Las plataformas de secuenciación de segunda generación se han aprovechado para la secuenciación de transcriptomas, también conocido como RNA-seq, y han desplazado incluso a técnicas para la cuantificación de niveles de expresión génica tan importantes como los microarreglos y el SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), que resultan además más costosas y laboriosas. Entre las ventajas del RNA-seq está una mayor sensibilidad que los microarreglos para detectar transcritos de baja expresión y las aplicaciones van más allá de comparaciones en la expresión génica, ya que no se requiere conocer la secuencia del genoma en estudio, lo que permite identificar nuevos genes, nuevos transcritos y variantes de empalme (*splicing*) alternativo.

La reducción en los costos de la secuenciación, así como el aumento de las secuencias disponibles de genomas y transcriptomas de humanos de diversas poblaciones, ha abierto nuevas posibilidades a la medicina genómica. En la actualidad es posible hacer medicina personalizada que permite, por ejemplo, identificar riesgos de padecer enfermedades o ventajas para la práctica de un deporte, por la presencia de variaciones en el genoma, correlacionarlas con la expresión génica, analizando el transcriptoma, así como con los datos biométricos de cada individuo.

En el año 2012 se empezaron a distribuir los secuenciadores de tercera generación, cuya característica es la secuenciación de una sola molécula en tiempo real, por lo que ya no es un problema tener bajas concentraciones de DNA y además los requerimientos de capacidad de cómputo para almacenamiento y ensamblaje de genomas a partir de secuencias cortas son mucho menores que en las plataformas anteriores. El equipo de tercera generación desarrollado por *Oxford Nanopore Technologies* es capaz de secuenciar en una sola corrida continua, el genoma del fago  $\phi$ -X174 de 5,375 pares de bases y se estima que es posible leer de forma continua alrededor de 100 Kb (kilobases – mil pares de bases) [3]. La tecnología aplicada en los secuenciadores de tercera generación es la detección de cambios de corriente eléctrica debidos al paso de moléculas de diferente tamaño a través de un nanoporo. Los nanoporos son canales de menos de 1 nm de diámetro y se forman embebiendo proteínas, como porinas bacterianas, en una membrana de polímeros sintéticos. Esta tecnología también se puede aplicar para identificar modificaciones epigenéticas del DNA y para secuenciar tanto RNA como proteínas (Fig. 1).

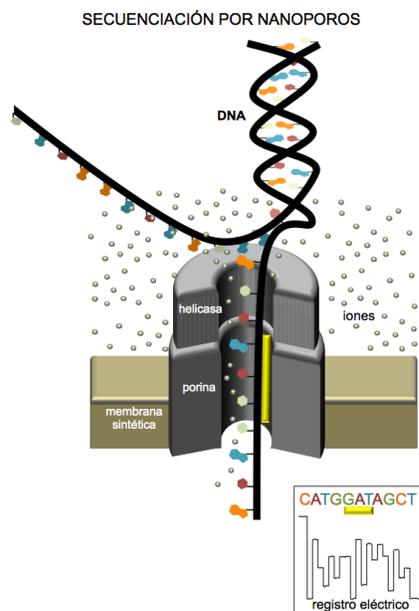


Figura 1. Ejemplo de un tipo de tecnología de tercera generación utilizada para la secuenciación de DNA por nanoporos. La cámara de secuenciación está formada por una membrana de un polímero sintético con miles de nanoporos, cada uno formado por una porina bacteriana acoplada a una DNA helicasa. La DNA helicasa desenrolla a la molécula de DNA y una de las dos hebras se desliza por el interior del poro, donde una molécula adaptadora regula la velocidad del proceso. A través del poro también cruza un

flujo de iones, generando una diferencia de potencial eléctrico, cuya magnitud es modificada diferencialmente según la base nitrogenada que esté cruzando por el poro.

### **La relevancia de algunos parámetros genómicos**

Gracias al auge y a la disminución de los costos de los sistemas de secuenciación, la genómica comparativa -el estudio comparativo de genomas completos- que inició hace algo menos de dos décadas, nos ha permitido conocer algunos parámetros genómicos relevantes. Inicialmente enfocado en analizar los genomas de los organismos modelo (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*) o de relevancia médica (*Plasmodium falciparum*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pestis*, *Anopheles gambiae*), actualmente el alcance de la genómica comparativa se extiende mucho más allá, con más de 50,000 genomas completamente secuenciados o en proceso, lo que nos ha permitido no sólo refinar muchos detalles del árbol de la vida, sino también entender la relación entre la función genómica y el fenotipo, así como trazar, dentro de las especies y cómo se han movido entre ellas, el viaje de los genes en términos evolutivos. La estructura de los genomas varía de manera importante entre las dos mayores ramas del árbol de la vida. Así, los genomas de virus y bacterias son un ejemplo de economía y eficiencia, de manera que tanto su replicación como su expresión ocurren de la forma más ágil posible, con prácticamente toda su extensión ocupada por secuencias codificantes, al extremo de que incluso muchos virus tienen genes de expresión temprana y tardía sobrepuestos, de modo que su expresión se regula diferencialmente de acuerdo a la etapa de infección. En cambio, entre los eucariontes, sobre todo en los más complejos (reptiles, mamíferos, algunas plantas), encontramos genomas de una gran extensión, ocupados por DNA no codificante que constituye secuencias espaciadoras o intergénicas, para muchas de las cuales estamos comenzando a comprender su función. Aproximadamente, un 20% de todo el DNA humano está constituido por intrones, secuencias que interrumpen la secuencia codificante de los genes, que serán transcritas y eliminadas antes de ser traducidas mediante el proceso conocido como empalme (*splicing*).

El valor C se refiere a la cantidad total de DNA (en pares de bases) que posee un genoma haploide y es característico para cada especie. Este valor varía considerablemente entre los organismos, desde microsporidias, con menos de  $10^6$ , hasta plantas con más de  $10^{11}$  pb [4]. Aunque “*grosso modo*” organismos menos complejos tienen un genoma más pequeño y organismos más complejos un genoma mayor, un protozoario como *Polychaos dubia* tiene uno de los

genomas más grandes hasta ahora descritos, con 670,000,000,000 pb, aunque actualmente existe la controversia de si realmente se trata de un genoma haploide [5]. Aún si se tratara de poliploidía (se estima que pudiera ser 40N), *Homo sapiens* sólo tiene 3,200,000,000 pb, ¡223 veces menos! Esta enorme cantidad de pares de bases no implica que ese genoma tenga un mayor número de genes; en el genoma de la mayoría de los eucariontes, las secuencias codificantes están partidas por secuencias no codificantes de gran tamaño conocidas como intrones, y poseen además, una gran cantidad de secuencias repetitivas no codificantes. A la falta de correspondencia entre el tamaño del genoma y la cantidad presumible de información que contiene, se le ha denominado paradoja del valor C. Gracias a las poderosas técnicas de secuenciación y anotación, actualmente se ha podido calcular cuál es el número de genes en cada uno de los genomas secuenciados hasta ahora. De modo que sabemos que el mayor tamaño del genoma se correlaciona directamente con una menor densidad génica, esto es, hay un menor número de genes por Mb en los genomas grandes. En la tabla I, se muestra el valor C, el valor G (densidad génica), el valor I (número de intrones) y el porcentaje del genoma en que se encuentran secuencias repetidas de levaduras, moscas y humanos. Así, mientras que prácticamente en una Mb del genoma de levaduras hay cerca de un 50% de secuencias codificantes, esta fracción disminuye al 12% en moscas y llega al 2% en humanos. Adicionalmente, la mayor cantidad de intrones presentes en organismos con mayor complejidad, aumenta aún más el poder codificante debido a las diversas combinaciones resultado del empalme alternativo.

Tabla I Algunos parámetros genómicos

<b>Característica</b>	<b>Levadura</b>	<b>Mosca de la fruta</b>	<b>Humano</b>
Valor C (Mb)	12.1	180	3,200
Densidad génica (número promedio de genes por Mb)	479	76	11
Número de intrones por gen (promedio)	0.04	3	9
Cantidad del genoma involucrado en secuencias repetitivas	3.4%	12%	44%

En este sentido, se podría decir que la variabilidad biológica se logra de muchas maneras y estas variaciones C, G, I, pueden tener implicaciones evolutivas relevantes. Dicho de otro modo: aunque hay excepciones,

evolutivamente la tendencia en un organismo con mayor complejidad anatómica es a tener una menor densidad génica, mayor número de intrones por gen y en general exones más pequeños. Si bien un genoma podría considerarse un conjunto de genes, existen otros aspectos como los mencionados, que permiten que la expresión diferencial y las interacciones moleculares sean más complejas de lo que hasta la fecha nos imaginamos.

### **La enciclopedia del DNA**

Así, en la actualidad ¿cuánto sabemos acerca del genoma humano? El genoma humano está formado por alrededor de 22,000 diferentes genes, los cuales contienen la información necesaria para codificar una cadena polipeptídica o una proteína en caso de contener una sola cadena. De la misma forma, también contiene información para sintetizar a los RNAs funcionales como los ribosomales, los de transferencia y una pléyade de RNAs no codificantes. Considerando lo anterior de manera general, se puede decir que cada persona (u organismo vivo), contiene en su DNA información suficiente para establecer su identidad [6].

Cabe señalar que nuestro conocimiento del genoma humano, a pesar de la información adquirida, es todavía incompleto y que tenemos un gran número de mecanismos moleculares por entender, tales como la regulación de la transcripción, el empalme alternativo, gran cantidad de factores de transcripción y su dinámica molecular, y hasta la producción de elementos génicos que son parte de la maquinaria transcripcional y traduccional que aún estamos a una cierta distancia de poder explicar y comprender en su gran extensión.

Las secuencias codificantes representan sólo alrededor del 2% del genoma humano y aun considerando a los genes y sus intrones, no representan más de 25% del total, entonces ¿el resto del genoma tiene una función o es solo basura? Con las cosas así, un importante paso tomado por la comunidad científica es el proyecto ENCODE (por sus siglas en inglés *Encyclopedia of DNA Elements*), cuyo objetivo principal es el de encontrar a los elementos funcionales que se encuentran delineados en el genoma humano, fuera de los genes estructurales propiamente dichos [6]. Es importante señalar que un elemento funcional es un segmento genómico discreto que genera un producto definido, ya sea proteína o RNA no codificante o también puede ser una secuencia de DNA de unión a proteína o una estructura específica de la cromatina [6].

A la fecha, el proyecto ENCODE ha analizado 1,640 conjuntos de datos derivados de 147 tipos celulares y uno de los resultados más sorprendentes es

que el 80% de nuestro genoma contiene elementos asociados a funciones bioquímicas o genéticas y que el 75% del genoma es transcrito, aunque en diferentes tipos de células. Los datos del proyecto ENCODE han dado una nueva revalorización al genoma humano, descartando la idea de que la mayor parte de nuestro genoma es “basura” [7]. Igualmente sorprendente ha sido el descubrimiento de que elementos regulatorios tales como los reforzadores transcripcionales (enhancers), que anteriormente se creía que eran secuencias a las cuales solamente se unían factores transcripcionales para potenciar la expresión de promotores, ahora se ha demostrado que también pueden generar sus propios transcritos, denominados eRNA [7,8]. Esto abre un nuevo y sorprendente panorama con respecto a la dinámica de la regulación génica.

Aunque la secuencia del genoma humano, y muchos otros genomas más, han sido dilucidados y conocemos “letra a letra” nuestro contenido genético -que nos hace únicos-, aún falta mucho camino por recorrer. Se podría decir que tenemos la cima ante nuestros ojos pero falta encontrar el camino para recorrerla y comprenderla en su total magnitud para poder hacer uso de ella de la mejor manera posible, que ayude al progreso científico, humanístico y social de los humanos.

### **El universo de secuencias: Número de genes y su relación con la secuencia, estructura y función de las proteínas. Un enfoque evolutivo**

Desde siempre, los biólogos y antes los naturalistas, se han preguntado cuál es la magnitud de la biodiversidad en este planeta, *i.e.* cuántas especies existen y/o han existido en la Tierra en toda su historia. Dependiendo de los autores, el número varía entre 30 y 120 millones [9]. De igual manera, los biólogos moleculares, nos podríamos preguntar cuál es la magnitud de la diversidad molecular. Dicho de otro modo ¿cuántos genes diferentes pueden existir y en particular, cuántos han sido utilizados por los sistemas biológicos a lo largo de su historia evolutiva? En principio la genómica debería empezar a darnos respuestas concretas. Sin embargo, las respuestas no dejan de ser algo extrañas, aunque tal vez no totalmente inesperadas [10]. Por simplicidad, vale la pena considerar la equivalencia de que en general, los genes se transcriben y se traducen en proteínas, de tal suerte que se puede hablar indistintamente de número de genes o número de proteínas -aunque la realidad es más complicada (mucho más complicada)- y de hecho es más directo considerar a los genes como unidades de codificación de cadenas polipeptídicas.

Para poder hacer una aproximación a responder las preguntas anteriores, necesitamos hacer algunos cálculos y asumir algunos enfoques teóricos. El primer punto, tiene que ver con el número total de secuencias de cadenas polipeptídicas posibles: el llamado universo de secuencias [11]. Derivado de datos de secuencias de genomas, hoy sabemos que tanto en procariontes como en eucariontes, la **longitud media** de una cadena polipeptídica es de 300 residuos de aminoácidos. Por supuesto hay cadenas mayores y menores, pero la tendencia principal es de la longitud referida. Ahora bien, sin asumir algunos otros escenarios tempranos en la evolución biológica, considerando a los 20 aminoácidos más comunes, el número total de combinaciones, esto es, cualquier orden posible de la cadena polipeptídica, es de  $20^{300}$ . Expresado en potencias de 10, el número es de  $2.037 \times 10^{390}$ , un número realmente gigantesco. De hecho es mayor que el número de átomos del universo. Ahora bien, ¿todas estas secuencias tendrán alguna función en el ámbito biológico? ¿De éstas cuantas se han usado en los sistemas biológicos? Rápidamente podemos descartar algunas, como por ejemplo 300 veces el mismo aminoácido o 300 veces la repetición de aminoácidos con características similares como su polaridad. La respuesta a la segunda pregunta requiere algunas suposiciones. También, derivado de datos genómicos, sabemos que el número **medio** de genes es de aproximadamente 3,000 en procariontes y 20,000 en eucariontes. Aunque nadie sabe realmente el número de especies de cada uno, *grosso modo* podemos asumir una proporción de 10 a 1; de tal manera que podemos calcular un número medio de 5,000 genes por organismo. Si multiplicamos este número por un valor aproximado de especies contemporáneas (alrededor de 30 millones), podemos concluir que el número total de genes actuales es de  $150 \times 10^9$  (genes / polipéptidos). Pero la vida ha existido durante 3,500 millones de años, y aunque es casi imposible calcular el tiempo de recambio de especies, el registro fósil nos sugiere que al menos el 99.9% de las especies están extintas. Por lo tanto, aunque no es un valor confiable, asumamos que el número de especies se mantiene constante a lo largo del tiempo con una tasa de recambio de especies de alrededor de 10 millones de años, con lo cual podemos concluir que en toda la historia de la vida y considerando tanto a las especies actuales como a las extintas, el número total de genes (polipéptidos) debe de estar entre  $10^{12}$  y  $10^{16}$ . Aunque hubiéramos tenido algún valor fuera de rango y siendo permisivos con los órdenes de magnitud, parece razonable que este número de genes (polipéptidos) sea a lo más de  $10^{20}$ , el cual, aunque grande, es notablemente menor que  $10^{390}$ . Dicho de otro modo, parecería que el universo biológico apenas ha comenzado a explorar las amplísimas potencialidades informacionales y que aún quedan  $10^{370}$  secuencias por explorar. Sin embargo, los mismos sistemas biológicos nos muestran que no todo es posible. Si la selección

de secuencias fuera al azar, al tomar una muestra de dos secuencias del universo completo, la posibilidad de que se parecieran sería bajísima y posiblemente no tendrían un significado biológico.

Por el contrario, al tomar una muestra de un gen particular de un organismo, resulta que lo más común es encontrar que en otro genoma existe una secuencia similar. A estas secuencias las llamamos homólogas, lo cual significa que han evolucionado a partir de una secuencia ancestral común y que no representan una muestra aleatoria. Prácticamente cualquier proyecto de secuenciación de un genoma, revela que la mayor parte de los genes no son únicos de la especie en cuestión, ya sea procarionte o eucarionte [12]; sino que se encuentran genes homólogos en muchos otros genomas. Dicho de otra manera, hay pocas cosas nuevas bajo el sol. Por ejemplo, los humanos y las bacterias compartimos genes de estrés con un alto grado de identidad y por supuesto los ejemplos son múltiples. A nivel de genes y sus polipéptidos codificados, lo que vemos es que evolutivamente la aparición de genes (polipéptidos) radicalmente nuevos es la excepción. Si consideramos los genes del repertorio básico de estructura y metabolismo, estos se encuentran desde los micoplasmas, hasta el hombre (por tomar dos extremos) [13]. Desde luego existen genes específicos de grupos taxonómicos, pero lo más común es que encontremos genes equivalentes (homólogos) en todas las ramas del árbol filogenético. Se ha dicho que la mutación es la materia prima de la evolución. Sin embargo, ésta no actúa sobre secuencias vírgenes, sino sobre secuencias ya probadas de los mismos genes (estos planteamientos no se pretenden aplicar a eventos del remoto pasado como el origen de la vida, el mundo del RNA, ni a los eventos iniciales en los que apareció el DNA). Cuando un gen se duplica y la mutación actúa sobre una de las copias, es posible que aparezca un cambio que pueda modificar levemente la estructura y la función, aunque el resto de la secuencia se mantiene muy parecida. Hablamos entonces de genes parálogos. Este proceso ha derivado en la aparición en los genomas de lo que se denominan familias multigénicas de las cuales hay muchísimos casos bien documentados, como el de las globinas (mioglobina y hemoglobina) en vertebrados. Pero aun en organismos más sencillos aparecen estas reiteraciones. Por ejemplo, en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, que tiene un pequeño genoma de 100 Mb y donde se calcula que debe haber no más de 13-14 mil genes, el número de familias multigénicas es elevado. Aun en el caso de la arquea *Methanococcus jannaschii*, cuyo genoma es de 1.66 Mb, se han encontrado 100 familias multigénicas de las cuales la mayor contiene 16 miembros. En el genoma de la *Taenia solium*, recientemente reportado, se han

detectado más de 70 copias de HSP70 [14]. Este panorama de genes o secuencias que son utilizadas y vueltas a utilizar con pequeñas variaciones, no es otra cosa más que puntualizar que posiblemente el número total de genes (polipéptidos) diferentes que se han utilizado en la biósfera en este planeta durante más de 3,500 millones de años, no importa en cuántas especies, es pavorosamente pequeño, cuando se compara con los números presentados anteriormente. Es difícil decir cuál es este número. Pero estos resultados nos sugieren entonces que este valor sería mucho menor que  $10^{14}$  ó  $10^{20}$ . Algunos cálculos de Wally Gilbert, sugieren que este número podría ser tan pequeño como  $10^4$  ó  $10^5$ . Adicionalmente, la estructura de las proteínas llega a estar mejor conservada que su secuencia. Existen numerosos ejemplos de proteínas que tienen una baja identidad en secuencia, pero que adoptan una estructura tridimensional similar y llevan a cabo procesos similares, lo cual puede ser interpretado en el sentido de que son homólogas. Por el otro lado, son pocos los casos en que la identidad es tan baja que la única explicación para entender sus similitudes en estructura tridimensional es que se trata de un caso de convergencia, aunque no es una situación habitual.

De alguna manera, lo anterior significa que parte del secreto de la diferenciación filogenética reside en qué combinación específica de genes básicos existe en un genoma y en cuáles son las diferencias en sus niveles de expresión. Podríamos en este momento repetir la pregunta, ¿qué características tienen estas secuencias que las hacen tan especiales, de tal manera que han sido seleccionadas para ser usadas por los sistemas biológicos? Desde luego no lo sabemos a ciencia cierta. Sin embargo hay algunas sugerencias, que por cierto tendrían que ver precisamente con las potencialidades de plegamiento tridimensional de las proteínas. Nuevamente, parte de la respuesta nos la dan los mismos sistemas biológicos.

Justificadamente, se puede decir que el plegamiento de una proteína es un evento de importancia central en biología. De hecho, la adquisición de la estructura tridimensional de una proteína, es una importante extensión implícita en el Dogma Central de la Biología Molecular [13]. Formulada en su forma más simple, la traducción de la secuencia de nucleótidos del gen, en la secuencia lineal de residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica, aporta la información necesaria para que al adoptar su estructura tridimensional, el polipéptido adquiriera su función biológica. El problema del plegamiento de un polipéptido fue reconocido hace más de medio siglo por Anson y Mirsky, quienes en 1925 observaron que la desnaturalización es un proceso reversible.

Posteriormente, en 1936, Mirsky y Linus Pauling sugirieron que las proteínas nativas tenían una estructura característica, la cual se pierde con la desnaturalización. Estas ideas culminaron finalmente con la demostración experimental de este paradigma central de la biología molecular por Christian Anfinsen en la década de los sesenta [15]. En sus experimentos clásicos, purificaba una proteína, la sometía a algún agente desnaturalizante (con lo cual la proteína perdía su función), después removía el agente desnaturalizante y si ponía a la proteína en condiciones favorables de temperatura, pH y fuerza iónica, después de un tiempo, la proteína recuperaba su función, indicando desde luego que había readquirido su conformación tridimensional nativa de manera espontánea. A partir de esos experimentos, decimos entonces, que la estructura tridimensional nativa funcional de una proteína es aquella que adopta en condiciones estándar de temperatura, pH y fuerza iónica, y que, en la secuencia de residuos de aminoácidos de cada proteína existe la información biológica para que este plegamiento se logre [15]. Dicho de otro modo la estructura nativa de una proteína está determinada por su secuencia de residuos de aminoácido. Ahora bien, en la estructura tridimensional de una proteína, ocurren interacciones de regiones que en la estructura primaria están alejadas (a veces más y a veces menos). Estas son interacciones estereoespecíficas no covalentes que pueden ser iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals y desde luego interacciones hidrofóbicas. Estas ocurren entre aminoácidos particulares, los cuales se pueden encontrar alejados en la estructura primaria, pero contiguos en la estructura tridimensional.

Sin embargo al final de los años 60s Cyrus Levinthal encontró una complicación que se ha denominado “la paradoja de Levinthal” y proviene de un ejercicio teórico [16]. Este investigador, razonó que una cadena polipeptídica desnaturalizada, como en el caso de los experimentos de Anfinsen, puede adoptar un número astronómico de conformaciones tridimensionales posibles (debido a la libertad de rotación en cada carbono alfa y a las diferentes interacciones de los aminoácidos). Por lo tanto, aún una pequeña cadena polipeptídica de 100 residuos de aminoácidos que explorara todas las estructuras tridimensionales posibles, requeriría un tiempo mayor que la edad del universo para llegar a su conformación tridimensional nativa. La paradoja consiste en que, desde los experimentos de Anfinsen y todos los que le han seguido, la cadena polipeptídica se pliega en tiempos bastante más cortos (hasta en milisegundos). Levinthal, que conocía estos resultados, propuso que esta paradoja podía ser resuelta si la cadena polipeptídica seguía rutas preferenciales de plegamiento *i. e.* no intenta todas las

conformaciones posibles. Actualmente contamos con mucha evidencia de que efectivamente estas rutas preferenciales ocurren y explican el plegamiento de las proteínas en tiempos muy cortos.

En concreto, en realidad existe un gran número de interacciones posibles entre los diferentes aminoácidos, y estas asociaciones aumentan con el peso molecular del polipéptido. El plegamiento de éste puede ser representado de manera esquemática como una serie de estados intermediarios que la proteína va adoptando como si fuera entrando en un túnel rugoso [11]. Antes de plegarse correctamente, un polipéptido puede adoptar un gran número de estados intermedios, algunos de los cuales pueden actuar como trampas de arena disminuyendo la velocidad y las probabilidades de llegar a la conformación tridimensional correcta. Así, cuando se trabaja con un polipéptido no muy grande, las interacciones incorrectas pueden modificarse en un lapso razonable de tiempo, hasta llegar a las interacciones que definen el estado de menor energía, que es lo que llamamos la conformación nativa [10].

La figura 2 muestra un ejemplo de un túnel de plegamiento que favorece energéticamente la llegada de la cadena polipeptídica a su conformación tridimensional nativa. Aunque lo anterior tiene usos e implicaciones en buscar simulaciones computacionales que puedan predecir el plegamiento de secuencias particulares, tiene una implicación biológica mayor. Dado que, como quedó indicado, el número de secuencias biológicamente relevantes es tan pequeño, es razonable asumir que siguen este plegamiento preferencial; mientras que el resto de las secuencias que no han sido usadas en los sistemas biológicos caen en trampas de plegamiento que complican enormemente el que puedan adoptar estructuras tridimensionales útiles. Extendiendo estos conceptos se podría hacer la siguiente consideración: comúnmente asumimos que una proteína particular ha sido seleccionada porque puede hacer algo, esto es, tener una función que por supuesto depende de su estructura tridimensional. Pero se podría hacer el planteamiento reverso: si una determinada secuencia de residuos de aminoácidos se puede plegar en un proceso termodinámicamente favorable, entonces la evolución se encargará de seleccionar y adecuar su función. Parafraseando esta idea la cuestión evolutiva sería “si te pliegas bien, ahora dime qué puedes hacer”. Dicho de otra manera, la característica más básica que llevó a la selección de los polipéptidos actuales (y por extensión de los pasados), es simple y sencillamente, su capacidad de plegamiento, que resulta en estructuras compactas termodinámicamente estables.

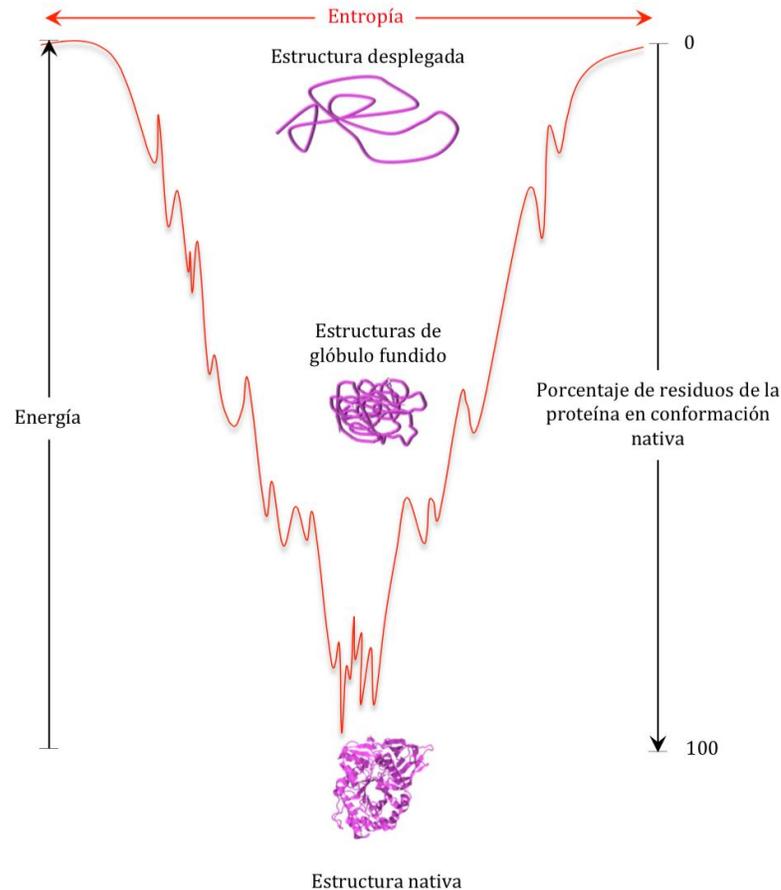


Figura 2. El plegamiento de una proteína frecuentemente es representado como un embudo o túnel, que está basado en el concepto de que al plegarse la proteína sigue un camino preferencial sin explorar todas las opciones de plegamiento. La proteína desnaturalizada es inestable y con alta energía libre. A medida que se pliega baja la energía libre así como el número de conformaciones al azar. En el final del embudo la cadena polipeptídica ha llegado a su conformación tridimensional nativa.

En conclusión: el factor primario de selección natural que operó en el vastísimo universo de secuencias, es la capacidad de adquirir una estructura tridimensional estable y, dado que son muy pocas las secuencias que lo pueden lograr, el número de genes que las codifican no es casi infinito, sino muy pequeño y es por esta razón que evolutivamente los genes y sus productos polipeptídicos son una repetición con variación de módulos informacionales y estructurales básicos.

### **Epigenética: una nueva dimensión de los genomas eucariontes**

Entre los hechos más fascinantes y enigmáticos de la biología destaca el de la diferenciación celular, esto es, la especialización estructural y funcional de las células que componen a un organismo multicelular a partir de una célula, el óvulo fecundado. Este proceso de diferenciación es la base de todo el desarrollo de un organismo, desde la fecundación de un óvulo por el espermatozoide (o por los granos de polen en un vegetal) hasta la formación de un organismo adulto. Durante mucho tiempo, la biología del desarrollo se estudió únicamente desde el punto de vista citológico e histológico, en función de los instrumentos analíticos y de los métodos experimentales disponibles y con el concurso de diversas disciplinas como la embriología, la genética y la inmunología, entre otras. Con el advenimiento de las nuevas metodologías y enfoques conceptuales aportados por la biología molecular, la biología del desarrollo entró a una nueva era, en la cual fue posible explorar los procesos de la diferenciación celular desde la óptica de la genética molecular, es decir, incorporando a la explicación celular la acción de los genes involucrados en las distintas etapas del desarrollo. De esta forma, la visión se profundizó, pero al mismo tiempo se complicó, pues ahora se tenían que describir no sólo los genes involucrados y sus productos proteicos, sino - y esto es una parte crucial -, su expresión diferencial (regulación) en los distintos tipos celulares. Lo anterior se puede sintetizar en una pregunta: ¿Cómo se regula y cómo se mantiene la transcripción diferencial del genoma en los diversos linajes celulares que componen a un organismo multicelular? Éste es el campo de acción de la epigenética.

Aunque existen diversas definiciones de epigenética, tal vez la que más ampliamente describa al término sea la siguiente: “Una característica epigenética es un fenotipo estable y heredable que resulta de cambios en un cromosoma, sin alteraciones en la secuencia de DNA” [17]. ¿Cuáles son los cambios cromosómicos que no alteran la secuencia del DNA? Estas modificaciones incluyen metilación del DNA, la interacción con pequeños RNAs de interferencia y variantes de histonas así como modificaciones post-traduccionales de las histonas tales como metilación, acetilación, fosforilación y monoubiquitinación [18]. Todas estas modificaciones, ligadas preferencialmente a la activación o inactivación de genes, es decir, a la regulación de su expresión, se dan en el contexto de la cromatina, formada por la interacción de 147 pares de bases de DNA cromosómico con un octámero de proteínas llamadas histonas (dos copias de H2A, H2B, H3 y H4), las cuales enrollan al DNA; este complejo se denomina nucleosoma y es la unidad estructural básica de la cromatina [19]. El problema

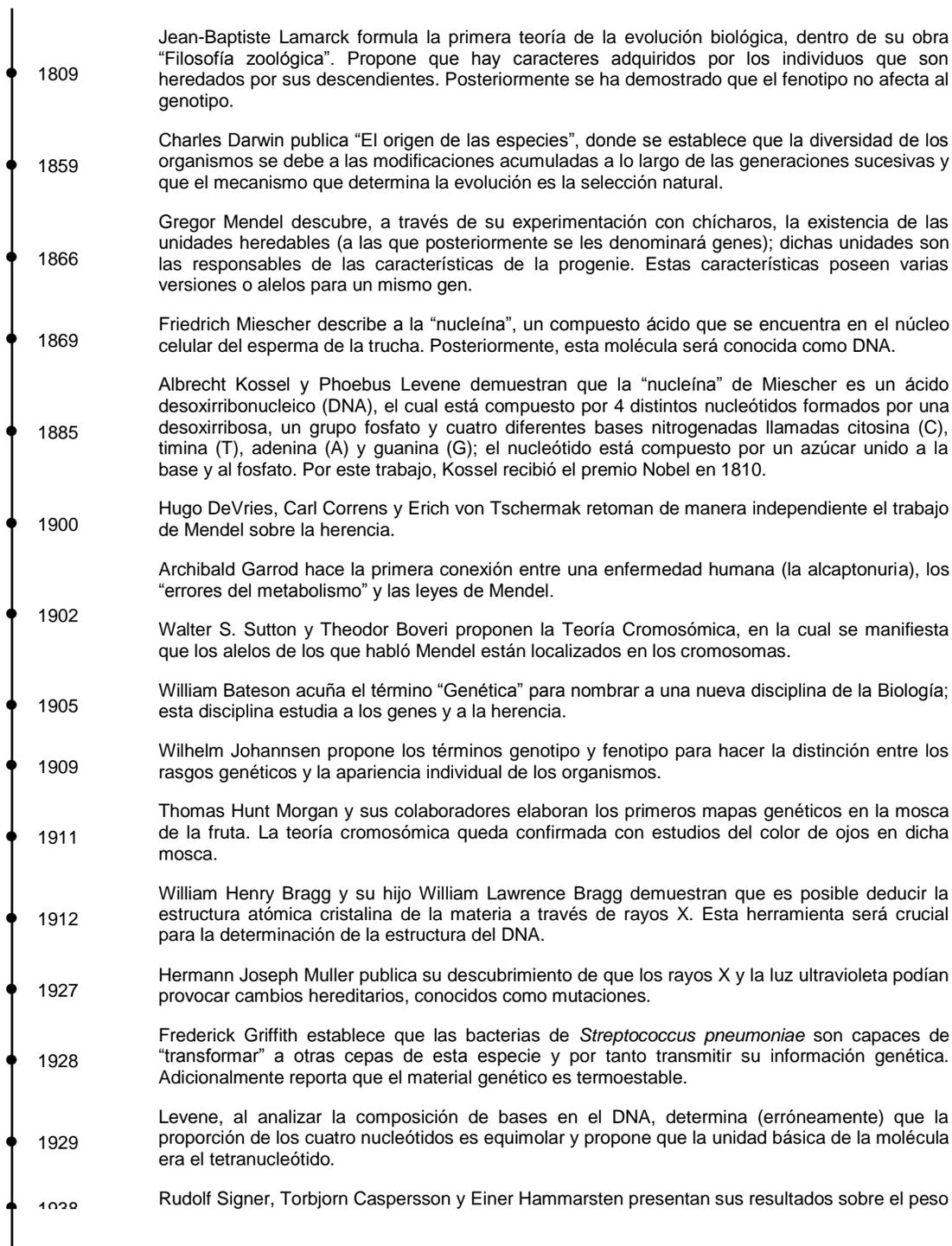
esencial de la epigenética es entender cómo los diferentes tipos celulares que integran a un organismo pluricelular - y que comparten el mismo genoma -, responden a distintos programas de expresión génica y cómo estos programas se perpetúan a través del proceso de mitosis. En términos moleculares, el problema involucra la interacción de proteínas activadoras y represoras, ya sea por unión al DNA o mediante los procesos de modificación y reorganización de nucleosomas que involucran metilaciones, acetilaciones y otros mecanismos sobre las histonas [20]. Cómo estas modificaciones pueden ser transmitidas a la descendencia a lo largo de la replicación del DNA y de la división celular para mantener la identidad específica de cada tipo celular es uno de los enigmas claves de la epigenética que permea toda la biología del desarrollo - incluyendo los procesos de regulación de la pluripotencialidad en células estaminales (*stem cells*) -, así como la biología de diversas patologías [21].

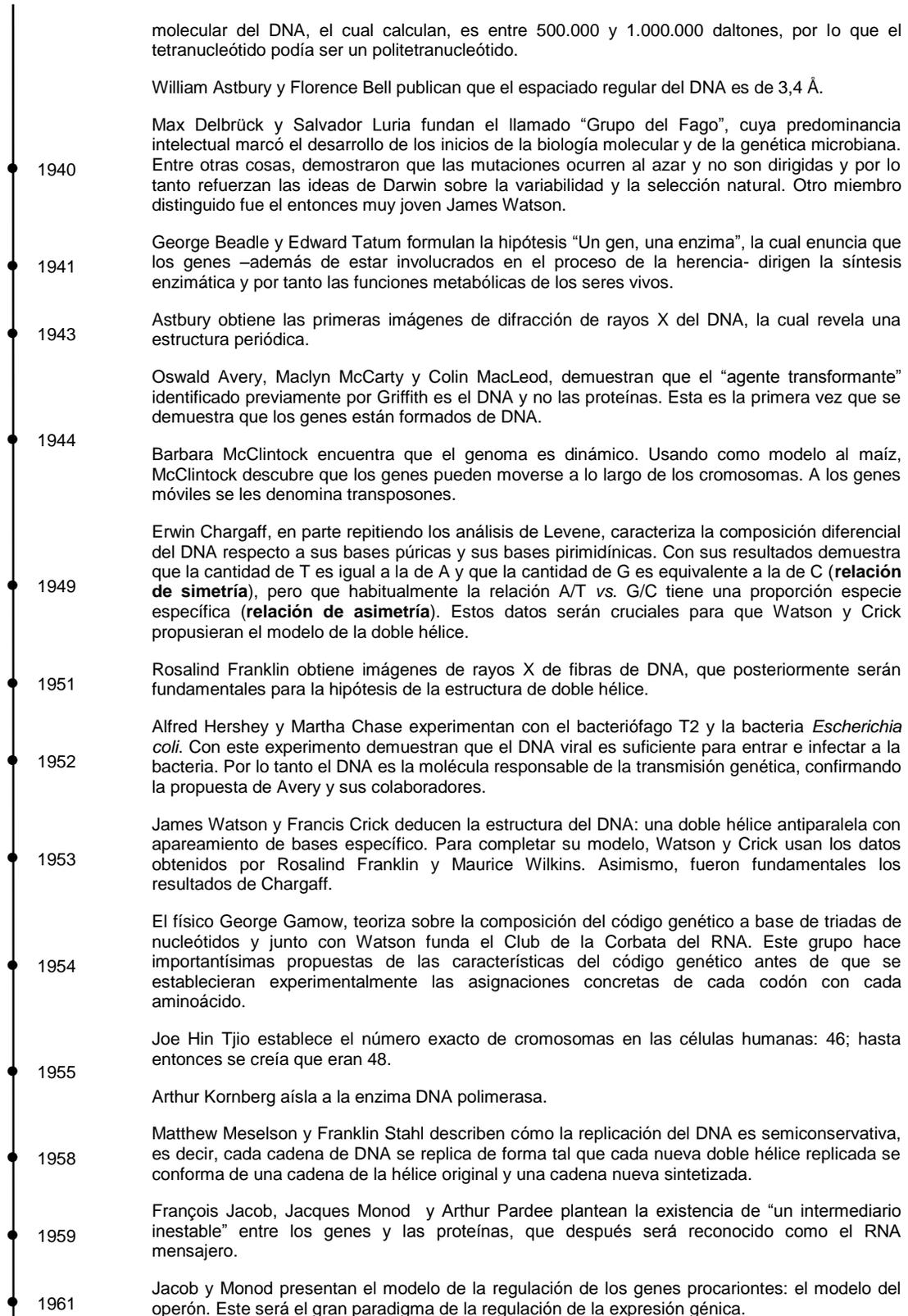
Una de las preguntas más importantes dentro del campo de la epigenética está relacionada con las etapas iniciales del desarrollo: ¿cuál es la condición epigenética del óvulo fecundado? ¿Persisten en el cigoto los estados epigenéticos del espermatozoide y del óvulo? Un reciente descubrimiento ha comenzado a responder a estas preguntas, demostrando que en el óvulo humano fertilizado se borran en gran proporción los estados de metilación del DNA, principalmente del genoma paterno, manteniéndose un bajo nivel de metilación durante la fase de blastocisto; en general, la metilación del DNA suprime la transcripción génica. Cuando ocurre la implantación del embrión en el útero y en paralelo con el inicio de la diferenciación celular, las células adquieren un rápido patrón de remetilación, característico de las células diferenciadas [22]. Lo anterior demuestra que la memoria de metilación es suprimida en el embrión humano, dando lugar a una reprogramación epigenética que marca el comienzo de la diferenciación celular.

En resumen, el estudio de los procesos epigenéticos está iluminando una de las áreas más importantes y maravillosas de la biología: cómo un mismo genoma puede “hablar tantos lenguajes” a través de los distintos tipos de células que componen a un organismo.

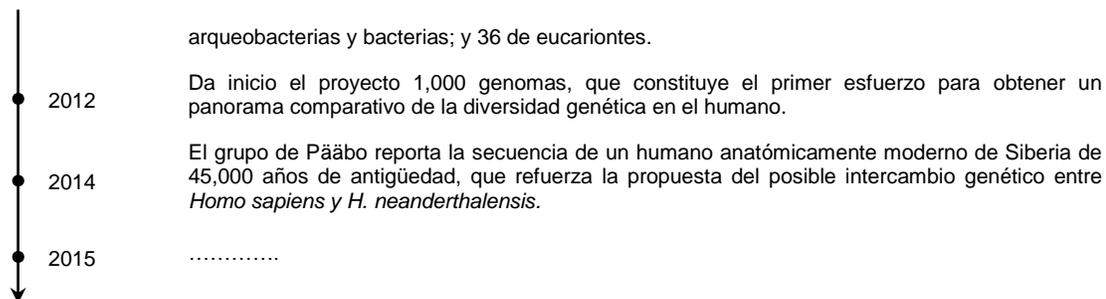
## Línea del tiempo Contribuciones históricas en el estudio del DNA, los genes y los genomas

NOTA. En general en las abreviaturas se usa la convención internacional, habitualmente el idioma inglés





	Jacob, Meselson y Sydney Brenner demuestran la existencia del mRNA.
	Marshall Nirenberg y Johann Heinrich Matthaei muestran la primera correspondencia codón-aminoácido, dando inicio a la elucidación de las asignaciones específicas del código genético.
1962	James Watson, Francis Crick y Maurice Wilkins reciben el Premio Nobel en fisiología y medicina.
1966	Nirenberg, Gobind Khorana, Matthaei y Philip Leder, entre otros investigadores, establecen la correspondencia específica entre codones y aminoácidos del código genético.
1970	Hamilton Smith purifica la primera enzima de restricción, cuyas aplicaciones permiten mayores avances en la investigación de genes y genomas.
1972	Herbert Boyer y Stanley N. Cohen desarrollan la tecnología del DNA recombinante.
1973	El grupo de Boyer y Cohen consiguen la replicación y la transcripción de un gen eucarionte de la rana <i>Xenopus</i> en <i>Escherichia coli</i> .
1975	Frederick Sanger, Alan Maxam y Walter Gilbert desarrollan métodos de secuenciación de DNA. De estos, el que será la base de la secuenciación posterior de genes y genomas será el método de Sanger.
1977	Richard Roberts y Phil Sharp descubren interrupciones no codificantes en los genes eucariontes a los cuales denominan intrones. Sanger y sus colaboradores publican la secuencia genómica completa de un virus, el de $\Phi$ X174.
1981	John B. Gurdon y Frank H. Ruddle insertan secuencias de DNA en óvulos fecundados de ratón. Por estos experimentos, extensión de sus resultados de 1962, Gurdon recibirá el premio Nobel en 2012.
1982	Se crea la base de datos GeneBank del NIH ( <i>National Institutes of Health, USA</i> ), la cual reúne todas las secuencias de DNA de acceso público que, además, incluyen anotaciones.
1986	Kary Mullis inventa la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR, con la cual se puede amplificar de manera exponencial un fragmento particular de DNA. El NIH inicia la secuenciación a gran escala de los genomas de <i>Mycoplasma capricolum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
1990	Frank Lipman y Amy Myers publican el algoritmo BLAST para el alineamiento y búsqueda rápida de secuencias homólogas en las grandes bases de datos. Inicia el Proyecto Genoma Humano cuyo objetivo principal es la obtención de una secuencia de referencia del genoma humano. Su primer director fue Watson quien fue relevado por Francis Collins.
1994	El jitomate transgénico llamado <i>Flavr Savr</i> es el primer alimento genéticamente modificado aprobado por la FDA, que resultó en un fracaso económico.
1995	Craig Venter, Hamilton Smith y Claire Fraser secuencian el primer genoma de un organismo de vida libre, <i>Haemophilus influenzae</i> .
1998	Venter funda la compañía Celera, cuyo objetivo es secuenciar el genoma humano en 3 años. Su estrategia "de escopetazo", difiere de la más ortodoxa usada por el consorcio público, que aunque es más lenta, es más segura (separar, clonar y secuenciar). No obstante, llegan a la meta simultáneamente.
2001	El Proyecto del Genoma Humano publica el borrador de la secuencia del genoma humano en la revista <i>Nature</i> el 15 de febrero. Celera lo publica en la revista <i>Science</i> .
2010	El grupo de Svante Pääbo reporta el primer borrador del genoma del hombre de Neanderthal. La secuencia completa la reportan el 2014.
2011	<i>Court of Appeals for Federal Circuit (CAFC)</i> analiza la posibilidad de patentar genes. En conclusión, se permite siempre y cuando dicho DNA no exista de manera natural. Los siguientes genomas se encuentran disponibles: 2,719 correspondientes a virus; 1,115 de



## Referencias

1. Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., *et al.* (1977) *Nature* **265**, 687- 695.
2. Reddy, T.B.K., Thomas, A., Stamatis, D., Bertsch, J., Isbandi, M., *et al.* (2014) *Nucl. Acids Res.* **43**, 1099 -1106.
3. Check, E. (2012) *Nature News* doi:10.1038/nature.2012.10051.
4. McGrath, C. L. y Katz L. A. (2004) *Trends Ecol. Evol.* **19**, 32-38.
5. Parfrey, L. W., Lahr D. J. G. y Katz, L. A. (2008) *Mol. Biol. Evol.* **25**, 787-794.
6. Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S., Collins, P., Davis, C. *et al.* (2012) *Nature* **489**, 57-74.
7. Djebali, S., Davis, C., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T. *et al.* (2012) *Nature* **489**, 101 - 108.
8. Ren, B. (2010) *Nature* **465**, 173 - 174.
9. Brocchieri L. y Karlin S. (2005) *Nucl. Acid. Res.* **33**, 3390 - 3400.
10. Qian J, Luscombe NM y Gerstein M. P. (2001) *J. Mol. Biol.* **313**, 673 - 681.
11. Alva V., Remmert M., Biegert A., Lupas A. N., y Johannes S. (2010) *Prot. Sci.* **19**, 124 - 130
12. Huynen M. A. y van Nimwegen E. (1998) *Mol. Biol. Evol.* **15**, 583 - 589.
13. Valdés López, V., Alba Lois, L., Segal Kischinevzky, C., *et al.* Apuntes sobre genómica. En Butanda Ochoa, A., Rendón Huerta, E., Guevara Fonseca, J., Guevara Flores A., Matuz Mares, D. y Vázquez Meza, H. (eds.) Mensaje Bioquímico, Volumen XXXVII. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, UNAM. ISSN-0188-137X. 2013. P 292 – 311.
14. Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garciarrubio, A., Sanchez-Flores, A. *et al.* (2013). *Nature* **496**, 57- 63.
15. Anfinsen, C. D. (1973) *Science* **181**, 223 - 230.
16. Levinthal, C. (1968). *J. Chim. Phys. Phys-Chim. Biol.* **65**, 44 - 45
17. Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R. y Shilatifard, A. (2009) *Gen. Devel.* **23**, 781-783.
18. Margueron, R. y Reinberg, D. (2010) *Nature Rev. Gent.* **11**, 285 - 296.
19. Orphanides, G. y Reinberg, D. (2000) *Nature* **407**, 471- 475.
20. Ptahne, M. (2007) *Curr. Biol.* **17**, 233-236.

21. Recillas –Targa, F. (2011) *Brief. Funct. Genom.* **10**, 1 - 2.
22. Reik, W. y Kesley, G. (2014) *Nature* **511**, 540 - 541.

### **Semblanza del Dr. Víctor Valdés López.**



El Dr. Valdés López es Profesor Titular del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realizó sus estudios de licenciatura (biología), maestría y doctorado en la misma Facultad de Ciencias y llevó a cabo estancias académicas en Montreal, Canadá y San Diego California. Fue becario del CONACYT, de la OEA y de la UNAM. También llevó a cabo una estancia académica extendida en el CINVESTAV, Unidad Irapuato. Estuvo adscrito temporalmente al Departamento de Biología Molecular de Plantas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Ha publicado más de 45 artículos y

capítulos de libros tanto de investigación como de divulgación en revistas nacionales e internacionales. Ha impartido más de 150 conferencias de divulgación y seminarios de investigación dentro y fuera de la UNAM. Ha dirigido diversas tesis de licenciatura y de posgrado. Desde 1977, ha impartido la asignatura de Biología Molecular en la carrera de Biología y además participa o ha participado como profesor en diversos cursos de posgrado dentro y fuera de la UNAM. El Dr. Valdés, ha desempeñado diversos cargos académico-administrativos en la UNAM. Entre otros, ha sido Coordinador del Departamento de Biología, Jefe de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias, Subdirector de Apoyo a la Docencia de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y Secretario Académico de la Coordinación de Estudios de Posgrado. Actualmente es Consejero Universitario por la Facultad de Ciencias. Sus áreas de trabajo han abarcado desde el metabolismo del hierro y la diferenciación de células sanguíneas en mamíferos, hasta la biología molecular de plantas y la genómica evolutiva y comparada.



Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 123-144, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GEMINALES DEL NEMATODO *CAENORHABDITIS ELEGANS*

### REGULATION OF GERMLINE APOPTOSIS IN THE NEMATODE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Láscarez Lagunas Laura Ivón<sup>1</sup> y Navarro González Rosa Estela<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

\*Autor de Correspondencia: Rosa E. Navarro. Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-600. México DF 04510, MEXICO.

Teléfono: (55) 56 22 56 09 Fax: (55) 56 22 56 09

E-mail: [rnavarro@ifc.unam.mx](mailto:rnavarro@ifc.unam.mx)

### RESUMEN

La apoptosis de las células germinales es un mecanismo que permite la preservación de la gónada en condiciones normales y en respuesta al estrés. En condiciones normales de crecimiento, en el nematodo *C. elegans* más de la mitad de las células germinales mueren durante la ovogénesis en un proceso conocido como apoptosis fisiológica. La función exacta de esta muerte celular es desconocida, pero se piensa que sirve para mantener la calidad de los ovocitos. La apoptosis de las células germinales puede inducirse por diferentes estímulos tales como las infecciones por patógenos, el daño al DNA, y el estrés ambiental.

La apoptosis de las células germinales inducida por patógenos parece ser un mecanismo de defensa del organismo contra infecciones. La apoptosis que se activa por daño al DNA permite al organismo no transferir daños a las siguientes generaciones. Y por último, la apoptosis inducida por tipos de estrés que no comprometen a la integridad genómica podría jugar un papel importante en mantener la calidad del citoplasma celular durante la ovogénesis. En esta revisión, nos enfocaremos en la regulación de la apoptosis de las células germinales en condiciones normales y de estrés.

**Palabras clave:** apoptosis, estrés, línea germinal, células germinales, *C. elegans*.

### ABSTRACT

Germ cell apoptosis is a mechanism that conserves the gonad under normal and stressful conditions. In *C. elegans* physiological germ cell apoptosis occurs commonly under oogenesis and it is estimated that eliminates more than fifty percent of cells. The purpose of this massive germ cell death is unknown but is believed that maintains oocyte quality. In addition, germ cell apoptosis can be induced by external factors like: pathogen infections, DNA damage and other types of stress. Germ cell apoptosis induced by pathogen infections seems to be an important defense mechanism for the whole organism. DNA damage-induced apoptosis avoids spreading mutations to further generations. Apoptosis induced by stresses that do not compromise genomic integrity could play an important role in the relocation of resources for proper oocyte development. In this review, we will focus on the regulation of germ cell apoptosis under normal and stress conditions.

**Keywords:** apoptosis, stress, germline, germ cells, *C. elegans*.

### Introducción

La apoptosis es una forma de muerte celular esencial en el desarrollo y la supervivencia de muchos organismos multicelulares. En mamíferos por ejemplo, la apoptosis somática es importante durante la formación de las extremidades, el establecimiento de las conexiones neuronales y el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos [1]. La apoptosis durante la ovogénesis, desde los invertebrados hasta los mamíferos como el ser humano, es común [2, 3] y crucial porque regula la producción y calidad de los ovocitos además de ser un mecanismo de defensa contra los cambios ambientales [3-5].

Gran parte de lo que se sabe acerca de la regulación de la apoptosis es gracias a los estudios que se han hecho en el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

Este nematodo es un excelente modelo para estudios de apoptosis debido a su simplicidad anatómica y genómica, la conservación de sus genes y la posibilidad de hacer genética. Como ejemplo de su simplicidad en sus vías de regulación, en el *C. elegans* hay sólo una caspasa, involucrada en la apoptosis mientras que en mamíferos existen hasta catorce [6, 7]. En *C. elegans* existen varios trabajos centrados en el estudio de la apoptosis de las células germinales. Sin embargo, todavía se desconoce mucho del propósito y la regulación de este proceso. La apoptosis de las células germinales se puede inducir por diferentes tipos de estrés, tales como las infecciones por patógenos, el estrés osmótico, el oxidativo, el térmico, el ayuno así como por la exposición a agentes genotóxicos [8-12].

En esta revisión ofreceremos un panorama de las investigaciones más recientes acerca de la regulación de la apoptosis de las células germinales del *C. elegans* en condiciones normales y de estrés. Iniciaremos describiendo la anatomía de la gónada del hermafrodita adulto así como las proteínas involucradas en el proceso de apoptosis. Continuaremos con una revisión de las diferentes vías de inducción que desencadenan la apoptosis fisiológica así como las inducidas por infecciones de patógenos, por daño al DNA, por estrés osmótico, oxidativo y térmico y finalmente por ayuno. Al finalizar, plantearemos algunas de las preguntas que aún quedan por resolver para comprender los mecanismos de regulación de la apoptosis de las células germinales en *C. elegans*.

#### **Anatomía de la gónada del adulto hermafrodita de *C. elegans***

La línea germinal está compuesta por células especializadas que dan origen a los ovocitos y espermatozoides. Las células germinales presentan ciertas particularidades, entre las que se encuentran que en algunas etapas de su desarrollo son pluripotentes e inmortales. Esto significa que dan origen a todos los tipos celulares de la siguiente generación y por lo tanto preservan las especies. Además de que son las únicas células en el organismo capaces de hacer meiosis [13, 14]. En esta revisión únicamente describiremos la anatomía de la gónada de la hermafrodita adulto (Fig. 1), pero para mayor información acerca del desarrollo completo de la línea germinal del nematodo sugerimos referirse a [13-15].

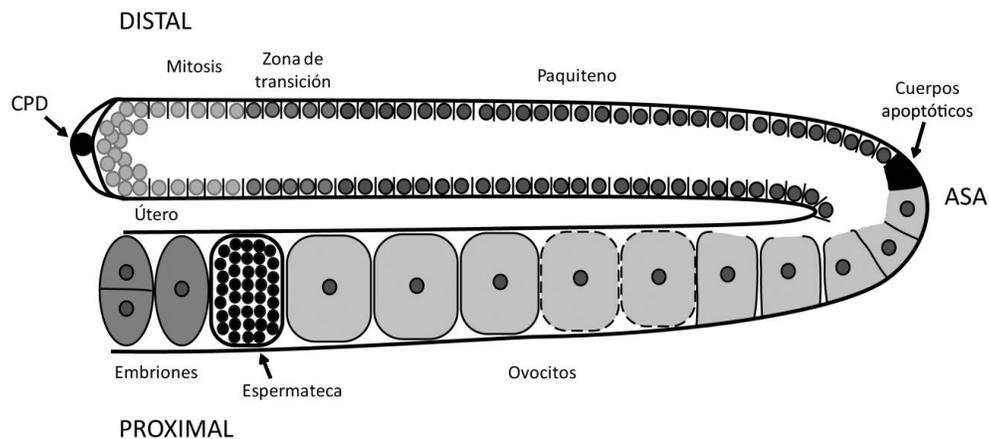


Figura 1. Anatomía de la gónada del hermafrodita de *C. elegans*. La gónada del hermafrodita está compuesta por dos brazos idénticos en forma de “U” conectados por un útero central. En este esquema sólo se muestra un brazo de la gónada para simplificar. La gónada es un sincicio en donde los núcleos tienen membranas parciales y comparten un citoplasma común. En la parte distal de la gónada (la más alejada del útero) se encuentra la célula de la punta distal (CPD), la cual mantiene el nicho de células germinales totipotenciales. En la zona de transición los núcleos salen de la mitosis y entran a la meiosis. Los primeros 40 núcleos que entran en meiosis forman ~160 espermartidas en el estadio larvario L4. El animal adulto sólo produce ovocitos, los cuales en la zona proximal son ovulados por señalizaciones de la gónada somática y los espermatozoides, pasan por la espermateca en donde son fertilizados y finalmente depositados en el útero. La apoptosis ocurre únicamente durante la ovogénesis en la zona del asa cuando los núcleos salen del paquiteno de la meiosis I.

La gónada de los adultos hermafroditas de *C. elegans* es un sincicio, lo que quiere decir que los núcleos están rodeados de membranas parciales y comparten un citoplasma común. Sin embargo, para fines prácticos nos referimos a estos núcleos con membranas parciales como células germinales. La gónada tiene dos brazos idénticos en forma de U que se encuentran unidos por el útero. Cada brazo tiene una polaridad distal a proximal, la parte más distal del brazo se encuentra en contacto con una célula de origen somático denominada célula de la punta distal (CPD) (Fig. 1). La CPD expresa el ligando del factor de crecimiento de la vía de Notch (LAG-2), el cual promueve la proliferación mitótica de las células germinales adyacentes formando un nicho de células troncales totipotenciales [16, 17]. Conforme las células germinales se alejan de la CPD, la señal de mitosis se pierde y las células entran en la meiosis (zona de transición). [18] (Fig. 1). Las 40 primeras células germinales de cada brazo que entran en meiosis, durante la etapa larvaria L4 se convierten en aproximadamente 160 células espermáticas que serán almacenadas en la espermateca. En la gónada del adulto se inicia la

producción de ovocitos, la cual continúa durante el resto del periodo reproductivo del animal [19, 20]. Durante la ovulación, el ovocito entra a la espermateca donde es fertilizado y el embrión es expulsado al útero. Durante la ovogénesis, los ovocitos obtienen una gran cantidad de citoplasma de la parte distal de la gónada que contiene entre otras cosas RNA mensajeros (RNAs) y proteínas [21, 22]. Algunos de estos RNAs son traducidos y otros son silenciados para prevenir una prematura diferenciación celular y así garantizar el correcto desarrollo embrionario [23-25].

### El proceso de apoptosis en *C. elegans*

En *C. elegans* la apoptosis puede ocurrir en tres diferentes estadios del desarrollo. La apoptosis somática, como su nombre lo indica, ocurre en los tejidos somáticos durante el desarrollo embrionario (a los 250-450 min. post-fertilización) y en el desarrollo post-embrionario (estadio L2) [26, 27]. La apoptosis fisiológica ocurre únicamente en la gónada durante la ovogénesis del adulto hermafrodita [28]. La apoptosis en *C. elegans* está dividida en cuatro pasos que ocurren de manera secuencial [6, 29]. El primer paso consiste en la activación de la muerte celular. En el segundo paso se activa la maquinaria central de apoptosis. En el tercer paso se ejecuta el proceso de apoptosis, el cual incluye la fragmentación del DNA y la fagocitosis de la célula en apoptosis por una célula vecina. Finalmente, en el último paso, la célula fagocitada es degradada (Fig. 2).

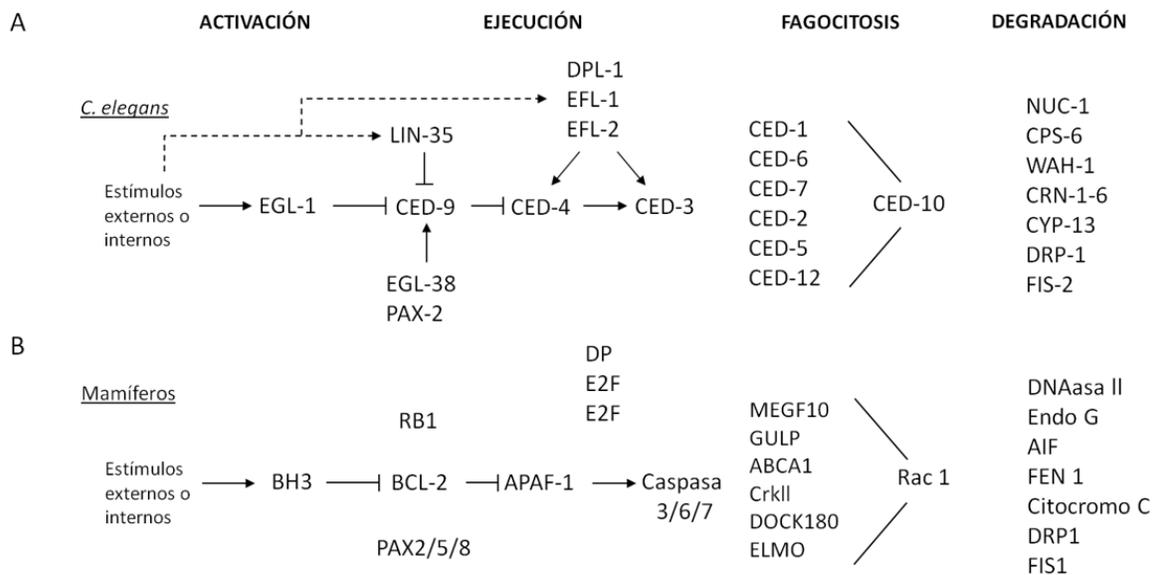


Figura 2. Proteínas involucradas en la apoptosis de *C. elegans* y mamíferos. La apoptosis se compone de cuatro etapas principales: activación, ejecución, fagocitosis y degradación.

A) Se muestran las vías y las proteínas que participan en el proceso de apoptosis en *C. elegans*. Consultar el texto para mayor detalle. B) Se muestran las vías y las proteínas que participan en el proceso de apoptosis en mamíferos. En mamíferos la proteína BCL-2 reprime a APAF-1 impidiendo con ello que se forme el apoptosoma y se active la caspasa CASP-9. Ante un estímulo que induce apoptosis se activan proteínas con dominio BH3 que provocan la formación del apoptosoma. Las principales diferencias entre la regulación de la apoptosis en *C. elegans* y mamíferos son: 1) el número de moléculas participantes (menos proteínas con dominio BH3 y sólo una caspasa ejecutora en el nematodo). 2) La falta de participación del citocromo C en la formación de apoptosoma en el nematodo.—: Interacción negativa. —>: Interacción positiva. ---->: Posible interacción.

La apoptosis en *C. elegans* requiere de una maquinaria central constituida por las proteínas CED-9, CED-4 y CED-3 [29]. CED-9 es el único miembro de la familia BCL-2 (linfoma de células B tipo 2) en el nematodo que protege a las células de este tipo de muerte [30]. La pérdida de la función de *CED-9* conduce a una muerte masiva de células, mientras que una ganancia de función en este gen protege de la apoptosis [30]. CED-4 (el homólogo del factor activador de la proteasa apoptótica 1, APAF-1) [31, 32] es una proteína adaptadora pro-apoptótica cuya ausencia ocasiona que las células sobrevivan a la señal de apoptosis [33]. CED-3 es una proteasa del tipo cisteín-aspartato homóloga a las caspasas en mamíferos y es la única proteína en *C. elegans* que se requiere para inducir apoptosis [34].

En condiciones de sobrevivencia, CED-9 se encuentra anclada a la superficie de la membrana externa de la mitocondria inhibiendo la apoptosis al unirse e inactivar a un dímero de CED-4 [32, 35] (Fig. 3). En la mayoría de los casos, la apoptosis en este nematodo se induce con la activación transcripcional del gen *egl-1* (el cual codifica para una proteína con dominio BH3) [31]. EGL-1 se une a la proteína CED-9, provocando un cambio conformacional que resulta en la liberación de CED-4 [32, 35] (Fig. 3). Este evento conduce a la formación del apoptosoma, el cual consiste de un octámero de CED-4 unido a dos moléculas del zimógeno de la caspasa CED-3 (Fig. 3) [35].

En contraste con *C. elegans*, en mamíferos el apoptosoma está formado por moléculas del citocromo C, APAF1, y la caspasa 9. En mamíferos, la formación del apoptosoma se induce por la acción de proteínas con dominio BH3 y la activación de la caspasa CASP-9 [36]. Existen dos diferencias principales que explican la pérdida de la participación del citocromo C en el apoptosoma del *C. elegans* [37]. La primera es que la proteína CED-4 no contiene el dominio WD40, el cual está presente en APAF1 y es el sitio de unión al citocromo C. La segunda, es que APAF1 se autoinhibe por el dominio CARD, el cual interacciona con el

dominio WD40. Mientras que en el nematodo, CED-4 está unido a CED-9 para prevenir su oligomerización y acceso a CED-3 para inhibir la apoptosis.

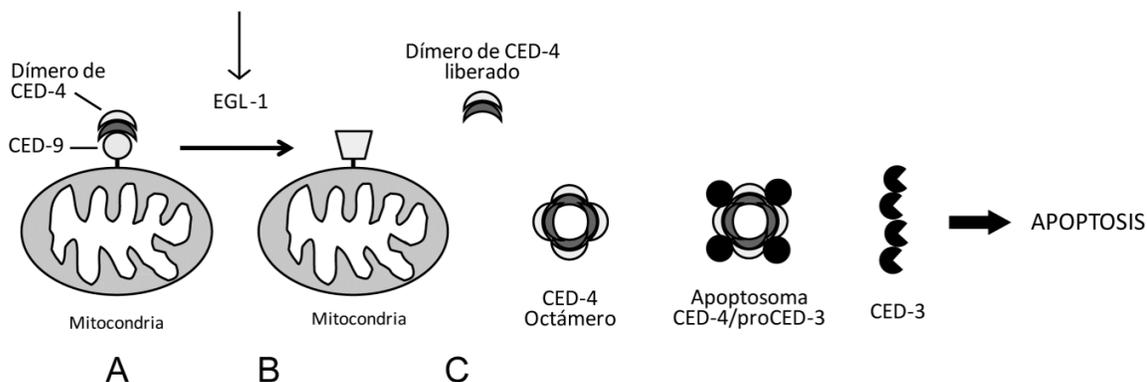


Figura 3. Inducción de apoptosis en *C. elegans*. A) La proteína anti-apoptótica CED-9 se encuentra anclada a la superficie de la membrana externa de la mitocondria, en donde en condiciones de sobrevivencia está unida a un dímero de CED-4. B) Ante un estímulo de apoptosis la proteína proapoptótica EGL-1 se acumula y se une a CED-9 induciendo un cambio conformacional que resulta en la liberación del dímero de CED-4. C) Una vez libres los dímeros de CED-4 se asocian en un octámero que recluta moléculas de la procaspasa proCED-3 para formar el apoptosoma. El apoptosoma desencadena la apoptosis promoviendo la autoactivación de la caspasa CED-3.

Una vez que las células han entrado en apoptosis son fagocitadas por las células vecinas para ser degradadas por fagolisosomas. Para una revisión detallada del proceso de degradación de cuerpos apoptóticos en *C. elegans* se recomienda consultar la siguiente revisión [38]. Brevemente explicaremos que en el proceso de fagocitosis participan dos vías principales: la primera está compuesta por el heterodímero de CED-5-CED-12 y sus reguladores CED-2, MIG-2 y UNC-73 (Fig. 2). El segundo grupo de moléculas involucradas en la fagocitosis está compuesto por el receptor de membrana CED-1 y su adaptador proteico CED-6 [39-44]. La proteína transportadora tipo ABC, CED-7, pertenece a este conjunto; y aunque no se conoce del todo su función se ha propuesto que promueve el reconocimiento del cuerpo apoptótico por CED-1 a través de un ligando fosfolipídico que se libera ya sea por transporte activo o por un mecanismo de flipasa [43]. Ambos grupos de genes convergen en la activación de CED-10 que participa en la reorganización de los filamentos de actina (Fig. 2) [45].

La degradación del DNA de la célula fagocitada está a cargo de proteínas con actividad de nucleasa como son NUC-1, CPS-6, WAH-1, CRN-1 a -6, CYP-13, DRP-1 y FIS-2 [46-51] (Fig. 2). El silenciamiento o la pérdida de la actividad de

algunos de sus genes resulta en la acumulación de células positivas para TUNEL en el embrión de *C. elegans* [46-50]. Estudios genéticos y de análisis de fenotipo indican que estos genes actúan en diferentes vías para promover la degradación del DNA de las células fagocitadas. *cps-6*, *wah-1*, *crn-1*, *crn-4*, *crn-5* y *cpy-13* actúan juntos en una vía y *crn-2* y *crn-3* actúan en una vía independiente [47, 49]. Las proteínas DRP-1 y FIS-2 actúan a nivel mitocondrial en una vía para facilitar la degradación de la célula fagocitada [51] (Fig. 2).

### **¿Por qué mueren las células germinales durante la ovogénesis?**

La apoptosis de células germinales, específicamente durante la ovogénesis, ha sido observada en diversos organismos [2, 3 y 52] y se han propuesto tres hipótesis para explicar este fenómeno [3]. En la primera se sugiere que las células germinales compiten por los nutrientes que permiten su sobrevivencia; por lo que si estos son escasos o no están accesibles, la célula germinal muere. Este tipo de muerte se observa en *Drosophila melanogaster* en donde una dieta baja en proteínas induce un aumento en la apoptosis de las células germinales [53]. También en *C. elegans*, se ha observado que el ayuno incrementa la apoptosis de las células germinales [9].

En la segunda hipótesis se propone que la apoptosis es el resultado de daños al DNA. Estos daños son la consecuencia de errores en la replicación del DNA, la incorporación errónea de nucleótidos, la radiación o la exposición a agentes químicos. En respuesta al estrés genotóxico, el organismo activa vías de señalización que monitorean si hay daño y, en su caso, detienen el ciclo celular, permitiendo la reparación del daño, y/o inducen apoptosis. Por ejemplo, se ha observado que en nematodos sometidos a radiación ionizante se detiene la progresión del ciclo celular resultando en una menor proliferación de las células germinales [54]. También en *C. elegans* se ha observado un incremento en la apoptosis de las células germinales cuando hay errores en la meiosis [3, 55]. En la última hipótesis se propone que las células destinadas a morir sirven como células nodrizas para el transporte de orgánulos, mRNA y proteínas dentro de otros ovocitos. Dichas células son eliminadas una vez que han llevado a cabo su función, este sería el caso de las células nodrizas de *Drosophila*, *Hydra* y probablemente *C. elegans* [3, 28].

Se ha visto que el bloqueo de la apoptosis de las células germinales por una mutación en el gen *CED-3* provoca una disminución en el tamaño y la calidad de los ovocitos, que se vuelve más evidente conforme avanza la edad del organismo [4]. Por esta razón se piensa que la apoptosis ayuda a la redistribución

de citoplasma para el correcto desarrollo de las células germinales durante la ovogénesis. La pérdida de función de los genes *CED-9* o la ganancia de función de *egl-1* no tienen efecto en la calidad de los ovocitos [4]. La función y regulación de la apoptosis de las células germinales no está completamente esclarecida pero se piensa que es un proceso importante para la fertilidad del animal.

### **Apoptosis fisiológica del *C. elegans***

La apoptosis fisiológica, denominada así porque ocurre bajo condiciones normales, elimina un alto porcentaje de las células germinales durante la ovogénesis [28, 56]. Este tipo de apoptosis ocurre en la región del asa de la gónada, en la cual las células germinales en desarrollo salen del estado de paquiteno de la profase I de la meiosis para entrar a diacinesis (Fig. 1). Cuando una célula germinal inicia la apoptosis es fagocitada rápidamente por el epitelio que envuelve a la gónada para formar un cuerpo apoptótico. La vía de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos de la gónada es la misma que la que opera en el soma [28].

La apoptosis fisiológica es ejecutada por la misma maquinaria que la apoptosis somática. Sin embargo, la inactivación de *CED-9* no depende de la proteína pro-apoptótica *EGL-1* [28]. Entre las proteínas que regulan la maquinaria de apoptosis fisiológica están *EGL-38*, *PAX-2*, *LIN-35*, *DPL-1*, *EFL-1*, *EFL-2*, *CSP-2* e *IFG-1* (Fig. 4A) [57-60]. *EGL-38* y *PAX-2* son miembros de la familia de factores de transcripción *PAX2/5/8*, los cuales activan la transcripción de *ced-9* para proteger a las células germinales de la muerte. Mutantes dobles en estos genes presentan una disminución importante del transcrito de *ced-9*, mientras que si se induce la expresión de *EGL-38* o *PAX-2* el RNAm de *ced-9* aumenta; estos resultados sugieren que hay una correlación entre los niveles de expresión de estos genes [59]. *LIN-35* (el homólogo de la proteína de susceptibilidad a retinoblastoma), actúa como un posible represor transcripcional de *ced-9* [60]. Mutantes en el gen *lin-35* presentan niveles de apoptosis fisiológica disminuidos debido al incremento en la transcripción de *ced-9* [60]. Las proteínas de unión a DNA que componen el heterodímero tipo E2F: *DPL-1*, *EFL-1* y *EFL-2* promueven la apoptosis de las células germinales a través de la activación de la transcripción de los genes *ced-4* y *ced-3* (Fig. 4A) [60].

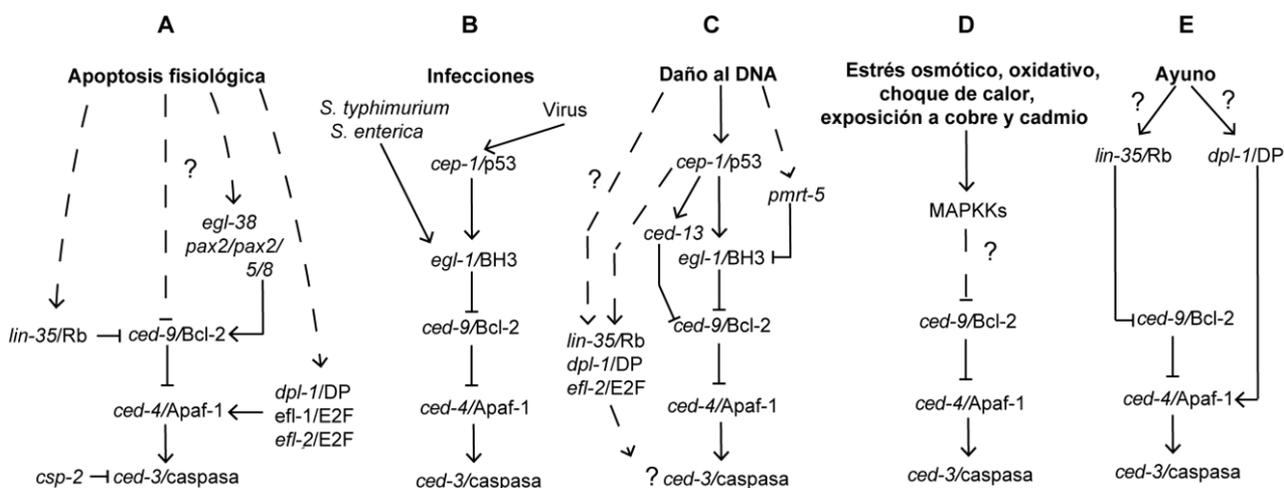


Figura 4. Tipos de inducción de la apoptosis en la línea germinal de *C. elegans*. A-E) Vías de inducción de apoptosis que convergen en la maquinaria central de apoptosis (*ced-9*, *ced-4* y *ced-3*). En el esquema se indican los genes que participan en cada vía. A) La apoptosis fisiológica es desencadenada por una vía aún desconocida que requiere parcialmente a los genes *lin-35/Rb*, *dpl-1/DP*, *efl-1/E2F* y *efl-2/E2F*. Las proteínas EGL-38 y PAX-2 activan la transcripción de *ced-9* mientras que LIN-35 la reprime. DPL-1, EFL-1 y EFL-2 son reguladores transcripcionales de *ced-3* y *ced-4*. CSP-2 inhibe la autoactivación del zimógeno pro-CED-3 en condiciones de sobrevivencia. B) Las infecciones por patógenos como *S. typhimurium* y *S. entérica* inducen apoptosis a través de la activación de *egl-1/BH3*. Las infecciones por virus (RNAi y cosupresión) requieren del gen *cep-1/p53* para inducir apoptosis. C) El daño a DNA induce apoptosis a través de la activación de *cep-1/p53* y *egl-1/BH3*. *lin-35*, *dpl-1*, y *efl-2* actúan río abajo o en paralelo a *cep-1/p53* y *ced-13* controlando la expresión de genes blanco no identificados. El gen *pmrt-5* actúa como inhibidor de la apoptosis debido a la radiación. D) El estrés osmótico, oxidativo, el choque de calor y la exposición a metales como cobre y cadmio requieren de la vía de la MAPKKs y son independientes de CEP-1 y EGL-1. E) La inducción de apoptosis por ayuno requiere de los genes *lin-35/Rb* y *dpl-1/DP*, los cuáles disminuyen la expresión del gen *ced-9* y aumentan la expresión de *ced-4*, respectivamente. Las líneas continuas representan interacciones genéticas confirmadas. Las líneas punteadas indican interacciones genéticas no confirmadas. El homólogo en mamíferos de cada gen se indica después de la diagonal. Los signos de interrogación indican que la vía todavía no ha sido esclarecida.

CSP-2 es una proteasa del tipo cisteín-aspartato que actúa en la gónada como un inhibidor de la apoptosis [58]. La actividad anti-apoptótica de CSP-2 consiste en la inhibición de la autoactivación del zimógeno pro-CED-3 por medio de una interacción directa en condiciones normales. Sin embargo, cuando CED-4 es activado en condiciones de inducción de apoptosis, CSP-2 no es suficiente para bloquear la actividad de CED-3 [58]. IFG-1 es el homólogo en *C. elegans* del factor de inicio de la traducción 4G [57]. La delección de esta proteína induce la traducción de CED-4 activando la apoptosis de las células germinales [57].

Los genes *cgh-1* y *car-1* también participan en la apoptosis fisiológica. CGH-1 es una helicasa de RNA con una caja tipo DEAD cuya inhibición o mutación produce infertilidad [61]. La inhibición de la expresión de *cgh-1* aumenta dramáticamente la apoptosis de las células germinales posiblemente a través de la vía de la apoptosis fisiológica [61]. CAR-1 es una proteína de unión a RNA que se asocia con CGH-1, DCAP-1 y CEY-2,-3,-4 [62, 63]. Estas proteínas forman parte de un complejo ribonucleoproteico en la gónada y en el embrión temprano. El silenciamiento de la expresión de *car-1* mediante RNA de interferencia (RNAi) produce un ligero decremento en la fertilidad y un incremento en los niveles de apoptosis [63]. Aunque la inhibición de la expresión de los genes *cgh-1* y *car-1* induce un aumento de la apoptosis fisiológica, no se sabe si esta inducción es causa de los otros defectos que provoca la ausencia de estos genes o si efectivamente su silenciamiento tiene un efecto directo sobre la maquinaria de apoptosis.

Con la finalidad de identificar genes que afectan la apoptosis de las células germinales, se inactivó mediante RNAi el 86% de los genes de *C. elegans* [64]. En este estudio se encontraron 21 genes cuya ausencia incrementa la apoptosis en la gónada. Mediante análisis de epistasis genético demostraron que 16 de estos genes inducen apoptosis a través de CEP-1 (p53) y 5 son independientes de esta vía. [64]. Dentro de los genes que inducen apoptosis de manera independiente de CEP-1/p53 están: *ced-9*, *cpb-3*, *rpf-1*, *pmk-3* y *gla-3*. CPB-3 es una proteína de poliadenilación ortóloga de la proteína ORB de *Drosophila* [65]. El gen *rpf-1* codifica para una proteína nuclear de ubiquitinación con dominio RING [64]. El gen *pmk-3* codifica para una de las tres isoformas de la MAPK p38 [64]. GLA-3 pertenece a la familia de proteínas de unión a RNA denominada TIS11, cuya pérdida de función genera un incremento importante en la apoptosis de las células germinales [66]. La elevada apoptosis observada como resultado del silenciamiento de *gla-3* se debe probablemente a la participación de este gen en la vía de señalización de las cinasas tipo MAPK. Evidencias bioquímicas y de análisis epistasis genética sugieren que GLA-3 interacciona directamente con MPK-1, un regulador esencial de la meiosis [66].

El número de genes que se han visto involucrados en la inducción de apoptosis fisiológica sigue en aumento. Recientemente se identificaron dos reguladores nuevos de este proceso: la proteína DLC-1 (Cadena Ligera de la Dineina 1) y el gen *dao-5* [67, 68]. La proteína DLC-1 se encuentra altamente conservada y forma parte del complejo motor de Dineina. La inhibición de *dlc-1* mediante RNAi induce un incremento importante en la apoptosis de las células germinales en *C. elegans* a través de los genes *lin-35*, *egl-1* y *ced-13* [67]. El gen

*dao-5* es un miembro de la familia de genes Nopp140, el cual participa en la transcripción del DNA ribosomal. Este gen juega un papel importante en la nucleogénesis del embrión temprano [68]. Una mutante nula en *dao-5* presenta altos niveles de apoptosis en la gónada causado posiblemente por el aumento en la transcripción de los genes *egl-1* y *ced-13* [69].

### **Inducción de apoptosis de las células germinales en condiciones de estrés**

Existen cuatro tipos de condiciones de estrés que inducen apoptosis a través de vías independientes (Fig. 4). El primero de ellos se debe a infecciones ya sea por patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Salmonella entérica* [10, 11] o por virus (Fig. 4B) [12]. El segundo tipo es ocasionado por el estrés genotóxico que causa un daño al DNA (Fig. 4C) [8]. El tercer tipo de apoptosis se puede inducir por estrés osmótico, oxidativo, térmico y la exposición a metales (Fig. 4D) [9, 70, 71] y finalmente el cuarto tipo de inducción de apoptosis responde al estrés nutricional (Fig. 4E) [9, 72]. A continuación se profundizará en cada uno de estos temas.

### **Apoptosis inducida por infecciones**

El nematodo *C. elegans* se alimenta en el laboratorio de una cepa de *Escherichia coli* no patógena (OP50). La exposición de los animales a bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium* y *S. enterica*, desencadena la apoptosis de las células germinales en un proceso dependiente de la proteína EGL-1 (Fig. 4B) [10, 11]. El mecanismo de inducción de apoptosis ante una infección se desconoce. Sin embargo, la apoptosis de las células germinales juega un papel importante durante la respuesta a un ataque por patógenos ya que los animales mutantes en *ced-3* y *ced-4* (en los cuales no hay apoptosis) mueren más rápidamente que la cepa silvestre cuando son sometidos a este tipo de infecciones [10, 11].

El silenciamiento de genes por medio de la cosupresión o RNAi induce la apoptosis de las células germinales en *C. elegans* [12]. Este fenómeno requiere de las proteínas CEP-1/p53 y SIR 2.1 (Fig. 4B). La apoptosis inducida por cosupresión responde a la introducción de múltiples copias de un gen específico en la línea germinal lo que también provoca el silenciamiento del gen endógeno correspondiente [73]. El RNAi y la cosupresión de genes han sido propuestos como mecanismos de defensa en contra de la invasión por secuencias repetidas, transposones, virus y transgenes exógenos [73].

### **Apoptosis inducida por daño al DNA**

En *C. elegans* el daño al DNA no induce apoptosis en las células somáticas pero sí en las germinales [8]. Se ha observado que cuando los nematodos son sometidos a diferentes tipos de estrés genotóxico como son: la radiación ionizante (IR), la radiación por UV, los agentes alquilantes y la incorporación errónea de uracilo al DNA se induce un incremento en la apoptosis de células germinales [8, 74-77]. La apoptosis de las células germinales inducida por daño a DNA requiere de la maquinaria central de apoptosis (CED-9, CED-4 y CED-3). La activación de esta maquinaria es a través de la proteína CEP-1, el homólogo de p53 en mamíferos [78]. CEP-1 promueve la transcripción de *egl-1* y la acumulación de esta proteína provoca que se interrumpa la interacción de CED-9-CED-4 desencadenando la apoptosis [78]. Durante el daño al DNA, CEP-1 también activa la transcripción de *ced-13* el cual tiene un dominio BH3 que puede unirse a CED-9 durante la radiación para inducir apoptosis (Fig. 4C) [79].

CEP-1/p53 es el regulador maestro de la apoptosis inducida por daño al DNA, sin embargo existen otros mecanismos de inducción que no requieren de su participación. Las proteínas LIN-35, DPL-1 y EFL-2 también regulan la apoptosis inducida por daño a DNA a través de la expresión de genes no identificados que actúan probablemente en paralelo o por debajo de *ced-9*, *ced-4* y *ced-3* (Fig. 4C) [60]. Por otro lado, la proteína SIR-2.1 actúa en paralelo y/o por debajo de *cep-1*. En respuesta a la radiación, SIR-2.1 se transloca del núcleo al citoplasma observándose en la periferia nuclear donde colocaliza transitoriamente con CED-4 [80].

PRMT-5 protege a las células germinales de la apoptosis durante el daño al DNA mediante la formación de un complejo con CEP-1 y CBP-1, el cual reprime la transcripción de *egl-1*. Esta proteína es la única que inhibe la apoptosis de las células germinales durante el daño al DNA (Fig. 4C) [81]. El gen *kri-1*, el homólogo de KRIT1/CCM1 el cual se encuentra mutado en la enfermedad neurovascular “malformación cerebral cavernosa” [82], es otro participante de la regulación de apoptosis inducida por daño a DNA independiente de CEP-1/p53. La ausencia de *kri-1* impide la inducción de apoptosis en la línea germinal de nematodos expuestos a radiación ionizante a través de un mecanismo que se encuentra por debajo de CEP-1/p53 pero por arriba de los genes de la maquinaria de apoptosis [82]. DLC-1 una de las proteínas descritas en la sección de apoptosis fisiológica también se encuentra involucrada en la regulación de apoptosis por daño al DNA. Animales *dlc-1(RNAi)* no elevan sus niveles de apoptosis como consecuencia de la exposición a la radiación ionizante [67]. Las evidencias sugieren que DLC-1

regula los niveles de *kri-1* y que funciona a través de la misma vía en respuesta a la RI.

Los reguladores de la traducción GCN-1 y ABCF-3 juegan un papel esencial en la muerte de las células germinales en respuesta a la radiación ionizante. GCN-1 y ABCF-3 interactúan físicamente *in vivo* sugiriendo que funcionan como miembros de un complejo proteico. La forma en la que GCN-1 y ABCF-3 regulan la inducción de apoptosis en esta condición de estrés no está bien esclarecida, pero se sabe que actúa por debajo de EGL-1 y CED-9 [83].

Las proteínas que participan en la reparación de rupturas en la doble hebra del DNA también se encuentran involucradas en la inducción de apoptosis por daño al DNA. Las rupturas en la doble hebra del DNA pueden generarse por estímulos externos como la radiación ionizante o mediante programas celulares como la meiosis [8, 84]. Mutantes en genes requeridos para la reparación de rupturas en la doble hebra del DNA o para la correcta recombinación homóloga como *rad-51* muestran excesiva apoptosis de las células germinales probablemente porque el daño persistente activa constitutivamente puntos de chequeo de daño [85]. Para una revisión específica del tema se puede consultar [86].

Finalmente, cabe mencionar que la exposición de los nematodos a contaminantes ambientales como el tri-butil estaño tiene un efecto en la inducción de apoptosis de las células germinales [87]. Recientemente, se demostró que el tratamiento de gusanos con tri-butil estaño incrementa el número de rupturas en la doble hebra del DNA por lo que se activan los puntos de revisión de daño. El incremento de apoptosis en las células germinales como respuesta al tratamiento con tri-butil estaño se inhibe en las mutantes *hus-1(op241)*, *mrt-2 (e2663)* and *p53/cep-1 (gk138)*, indicando que los puntos de chequeo del DNA y la proteína p53 son esenciales en este proceso [87].

### **Apoptosis inducida por estrés osmótico, oxidativo y térmico**

Otra de las vías de inducción de apoptosis de las células germinales es la que se desencadena por factores que no alteran la integridad genética, pero que posiblemente afectan vías de señalización. En nuestro laboratorio se observó que la exposición al estrés osmótico, oxidativo y choque de calor induce un incremento en la apoptosis de las células germinales [9]. Esta vía de apoptosis es independiente tanto de la proteína CEP-1/p53 como de EGL-1 (Fig. 4D). Este tipo de apoptosis es inducida por la vía de las Map cinasas (MAPKKs) que regulan a las cinasas tipo Jun y Fos (JNK y p38) [9]. En este trabajo se observó que

animales mutantes en las cinasas tipo MAPKK *mek-1* y *sek-1* así como en la cinasa antagonista de p53 (ABL-1) no son capaces de inducir apoptosis en respuesta al estrés osmótico, oxidativo y/o choque de calor.

### **Apoptosis inducida por exposición a metales**

La exposición de los nematodos a algunos metales como el cobre y el cadmio es otro de los estímulos que induce apoptosis de las células germinales [70, 71]. La exposición de nematodos al cobre incrementa el número de células germinales en apoptosis de una manera dosis-dependiente. La apoptosis inducida por exposición al cobre no depende de los genes *egl-1* y *abl-1*. Sin embargo, este tipo de apoptosis depende parcialmente de genes implicados en las respuestas de daño al DNA como *hus-1*, *clk-2* y *cep-1* [71]. Lo que indica que probablemente la exposición a cobre induce daño al DNA. Este tipo de muerte también depende de la activación de los genes de la vía de JNK y p38 con la excepción de la cinasa efectora *pmk-3* [71].

La exposición de animales a dosis que no son letales de cadmio incrementa la apoptosis de las células germinales en un proceso dependiente de la dosis [70]. A pesar de que la apoptosis inducida por cadmio no depende de *cep-1/p53*; se ha visto que si depende de otros genes de la vía de daño a DNA como *hus-1* [70]. Al igual que en el caso del cobre, el cadmio induce apoptosis a través de las cascadas de señalización de las MAPKKs: JNK y p38 [70].

### **Apoptosis inducida por Ayuno**

El ayuno incrementa el número de células germinales que mueren por apoptosis de una manera independiente de los genes *egl-1*, *cep-1*, *mek-1*, *sek-1* o *abl-1* [9]. Trabajo experimental realizado en nuestro laboratorio sugirió que el mecanismo de inducción de apoptosis por ayuno requiere de las proteínas LIN-35 y DPL-1 [72]. Nuestros datos sugirieron que durante el ayuno, la expresión de LIN-35 se incrementa generando con ello una regulación negativa sobre la expresión de *ced-9*. Este dato combinado con una traducción ineficiente del RNAm de *ced-9* genera una reducción importante en los niveles de expresión de la proteína CED-9. Por otro lado, el mRNA de *dpl-1/DP* se acumula y genera una regulación positiva sobre la expresión de *ced-4* reforzando así el desencadenamiento de la muerte celular bajo estas condiciones [72].

### **Observaciones finales**

A pesar de que en los últimos años se han publicado varios estudios acerca de la regulación de la apoptosis de las células germinales en el nematodo *C.*

*elegans*, todavía desconocemos los mecanismos por los cuales se induce la apoptosis fisiológica. Todavía no sabemos cómo dentro del sincicio de la gónada, se toma la decisión de qué célula germinal se eliminará por apoptosis y cuál va a diferenciarse en un ovocito. Una posibilidad es que de alguna manera se monitoree la cantidad y/o calidad del citoplasma que tiene cada núcleo y que si no cubre ciertos requisitos éste sea eliminado. Este dato se apoyaría en que la apoptosis ocurre principalmente en la zona donde los ovocitos succionan el citoplasma justo antes de cerrarse completamente y aislarse del sincicio [28, 88]. De tal manera que las células germinales adyacentes se quedarían sin citoplasma.

En cuanto a la función de la apoptosis de las células germinales es posible que ocurra por más de una razón a juzgar por el número variado de mecanismos que la regulan. La necesidad de la apoptosis fisiológica en el mantenimiento de la homeostasis de la línea germinal se ve reforzada mediante el incremento de apoptosis observado en condiciones de estrés por lo que es posible que estos procesos compartan reguladores. Por ejemplo, los genes *lin-35*, *dpl-1* y *efl-2* participan en la activación de la apoptosis fisiológica mediante la regulación de la transcripción de los genes *ced-9*, *ced-4* y *ced-3* (Fig. 4A) mientras que estos mismos (*lin-35*, y *dpl-1*) regulan la apoptosis de las células germinales debido a un daño al DNA y al ayuno (Figura 4C y E) [60, 72]. También se ha observado que la apoptosis de las células germinales y somáticas comparte reguladores mediante otra vía. Por ejemplo, EGL-1 regula la apoptosis somática durante el desarrollo embrionario y al mismo tiempo la de la gónada debido a una infección por patógenos [10, 11].

Estas evidencias sugieren que aunque la apoptosis fisiológica y la inducida por diferentes estímulos son procesos independientes pueden converger en algún punto mediante la utilización de proteínas en común. Se requieren nuevos estudios que descubran nuevos componentes implicados en la regulación de este proceso.

### **Agradecimientos**

Queremos agradecer a las siguientes instituciones por su financiamiento: PAPIIT-UNAM (Proyectos Número: IN207412 e IN207415), SEP-CONACYT (Proyectos número: 103856 y 220987), Fundación Miguel Alemán y Universidad Nacional Autónoma de México. LILL recibió una beca de Doctorado de CONACYT y PAPIIT-UNAM (IN207412).

## Referencias

1. Twomey, C., and McCarthy, J. V. (2005). *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **9**, 345-359.
2. Baum, J. S., St. George, J. P., and McCall, K. (2005). *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**, 245-259.
3. Tilly, J. L. (2001). *Nat Rev Moll Cell* **2**, 838-848.
4. Andux, S., and Ellis, R. E. (2008). *PLoS GENETICS* **4**, 1-13.
5. Angelo, G., and Van Gilst, M. R. (2009). *Science* **326**, 954-958.
6. Lettre, G., and Hengartner, M. O. (2006). *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 97-108.
7. Nicholson, D. (1999). *Cell Death and Differentiation* **6**, 1028-1042
8. Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., *et al.* (2000). *Molecular Cell* **5**, 435-443
9. Salinas, L. S., Maldonado, E., and Navarro, R. E. (2006). *Cell Death and Differentiation* **13**, 2129-2139.
10. Aballay, A., and Ausubel, F. M. (2001). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 2735-2739.
11. Aballay, A., Drenkard, E., Hilbun, L. R., and Ausubel, F. M. (2003). *Current Biology* **13**, 47-52.
12. Adamo, A., Woglar, A., Silva, N., *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 3440-3445.
13. Hubbard, E. J. A., and Greenstein, D. (2000). *Developmental Dynamics* **218**, 2-22.
14. Seydoux, G., and Schedl, T. (2001). *Int. Rev. Cytol.* **203**, 139-185.
15. Schedl, T. (ed) (2013) *Germ Cell Development in C. elegans*, Vol. 757, Springer, New York.
16. Henderson, S. T., Gao, D. L., Lambie, E. J., and Kimble, J. E. (1994). *Development* **120**, 2913-2924.
17. Kimble, J., and White, J. (1981). *Dev Biol.* **81**, 208-219.
18. Crittenden, S., Troeml, E., Evans, T., and Kimble, J. (1994). *Development* **120**, 2901-2911.
19. Hirsh, D., Oppenheim, D., and Klass, M. (1976). *Dev Biol.* **49**, 200-219.
20. Hall, D., Winfrey, V., Blaeuer, G., *et al.* (1999). *Dev Biol.* **212**, 101-123.
21. Gibert, M., Starck, J., and Beguet, B. (1984). *Biol Cell* **50**, 77-85.
22. Schisa, J. A., Pitt, J. N., and Priess, J. R. (2001). *Development* **128**, 1287-1298.
23. Jan, E., Motzny, C., Graves, L., and Goodwin, E. (1999). *EMBO J.* **18**, 258-269.
24. Zhang, B., Gallegos, M., Puoti, A., *et al.* (1997). *Nature* **390**, 477-484.
25. Draper, B., Mello, C., Bowerman, B., *et al.* (1996). *Cell* **87**, 205-216.
26. Sulston, J. E., and Horvitz, H. R. (1977). *Developmental Biology* **56**, 110-156.
27. Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, G., and Thomson, J. N. (1983). *Developmental Biology* **100**, 64-119.
28. Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartwig, E., *et al.* (1999). *Development* **126**, 1011-1022.

29. Darland-Ransom, M., Wu, Y.-C., and Xue, D. (2009) Programmed cell death in *C. elegans*. in *Essentials of Apoptosis*. (Yin, X.-M., and Dong, Z. eds.), 2nd. Ed., Humana Press., New York, NY. pp 355-373.
30. Hengartner, M. O., Ellis, R. E., and Horvitz, H. R. (1992). *Nature* **356**, 494-499.
31. Conradt, B., and Horvitz, H. (1998). *Cell* **93**, 519-529.
32. del Peso, L., Gonzalez, V., Inohara, N., Ellis, R., and Nuñez, G. (2000). *J Biol Chem* **275**, 27205-27211.
33. Yuan, J., and Horvitz, H. (1990) . *Developmental Biology* **138**, 33-41.
34. Xue, D., Shaham, S., and Horvitz, H. R. (1996). *Genes & Development* **10**, 1073-1083.
35. Yan, N., Chai, J., Lee, E., Gu, L., and Liu, Q. (2005). *Nature* **437**, 831-837.
36. Jiang, X., and Wang, X. (2004). *Annual Reviews Biochemistry*. **73**, 87-106.
37. Wang, C., and Youle, R. J. (2009). *Annu. Rev. Genet.* **43**, 95-118.
38. Kinchen, J. M., and Hengartner, M. O. (2005). *Curr. Top. Dev. Biol.* **65**, 1-45.
39. Chung, S., Gumienny, T. L., Hengartner, M. O., and Driscoll, M. (2000). *Nat Cell Biol* **2**, 931-937.
40. Gumienny, T. L., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A. C., *et al.* (2001). *Cell* **107**, 27-41.
41. Wang, X., Wu, Y. C., Fadok, V. A., *et al.* (2003). *Science* **302**, 1563-1566.
42. Wu, Y. C., Tsai, M. C., Cheng, L. C., *et al.* (2001). *Dev. Cell* **1**, 491-502.
43. Zhou, Z., Hartwig, E., and Horvitz, H. R. (2001). *Cell* **104**, 43-56.
44. Ellis, R. E., Jacobson, D. M., and Horvitz, H. R. (1991). *Genetics* **129**, 79-94.
45. Kinchen, J., Cabello, J., Klingele, D., *et al.* (2005). *Nature* **434**, 93-99.
46. Parrish, J., Li, L., Klotz, K., *et al.* *Nature* **412**, 90-94.
47. Parrish, J. Z., and Xue, D. (2003). *Mol. Cell* **11**, 987-996.
48. Parrish, J. Z., Yang, C., Shen, B., and Xue, D. (2003). *EMBO J.* **22**, 3451-3460.
49. Wang, X., Yang, C., Chai, J., *et al.* (2002). . *Science* **298**, 1587-1592.
50. Wu, Y. C., Stanfield, G. M., and Horvitz, H. R. (2000). *Genes & Development* **14**, 536-548.
51. Breckenridge, D. G., Kang, B. H., Kokel, D., *et al.* (2008). *Mol Cell* **31**, 586-597.
52. Greenwood, J., and Gautierb, J. (2005). *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**, 215-224.
53. Drummond-Barbosa, D., and Spradling, A. C. (2001). **231**, 265-278.
54. Stergiou, L., and Hengartner, M. O. (2004) . *Cell Death and Differentiation*. **11**, 21-28.
55. Bhalla, N., and Dernburg, A. F. (2005). *Science* **310**, 1683-1686.
56. Jaramillo-Lambert, A., Ellefson, M., Villeneuve, A., and Engebrecht, J. (2007). *Dev Biol.* **308**, 206-221.
57. Contreras, V., Richardson, M., Hao, E., and Keiper, B. (2008). *Cell Death and Differentiation* **15**, 1232-1242.

58. Geng, X., Zhou, Q. H., Kage-Nakadai, E., *et al.* (2009). *Cell Death and Differentiation* **16**, 1385-1394.
59. Park, D., Jia, H., Rajakumar, V., and Chamberlin, H. M. (2006). *Development* **133**, 4193-4202.
60. Schertel, C., and Conradt, B. (2007). *Development* **134**, 3691-3701.
61. Navarro, R. E., Shim, E. Y., Kohara, Y., *et al.* (2001). *Development* **128**, 3221-3232.
62. Audhya, A., Hyndman, F., McLeod, I. X., *et al.* (2005). *J Cell Biol* **171**, 267-279.
63. Boag, P. R., Nakamura, A., and Blackwell, K. (2005). *Development* **132**, 4975-4986.
64. Lettre, G., Kritikou, E. A., Jaeggi, M., *et al.* (2004). *Cell Death and Differentiation* **11**, 1198-1203.
65. Hasegawa, E., Karashima, T., Sumiyoshi, E., and Yamamoto, M. (2006). *Developmental Biology* **295**, 689-699.
66. Kritikou, E. A., Milstein, S., Vidalain, P. O., *et al.* (2006). *Genes & Development* **20**, 2279-2292.
67. Morthorst, T., and Olsen, A. (2013). *Cell Death and Disease* **4**, 1-11.
68. Korcekova, D., Gombitova, A., Raska, I., *et al.* (2012). *PLoS One* **7**, e40290.
69. Lee, C.-C., Tsai, Y.-T., Kao, C.-W., *et al.* (2014). *Cell Death and Disease* **5**, 1-11.
70. Wang, S., Tang, M., Pei, B., *et al.* (2008). *Toxicological Sciences* **102**, 345-351.
71. Wang, S., Wub, L., Wanga, Y., Luo, X., and Lu, Y. (2009). *Chemico-Biological Interactions* **180**, 151-157.
72. Lascarez-Lagunas, LI, Silva-García, CG., Dinkova, T. D., and Navarro, R. E. (2014). *Mol. Cell. Biol.* **34**, 2499-2516.
73. Dernburg, A. F., Zalevsky, J., Colaiácovo, M. P., and Villeneuve, A. M. (2000). *Genes & Development* **14**, 1578-1583.
74. Dengg, M., Garcia-Muse, T., Gill, S. G., *et al.* (2006). *EMBO Rep.* **7**, 1046-1051.
75. Derry, W. B., Bierings, R., van Iersel, M., *et al.* (2007). *Cell Death and Differentiation* **14**, 662-670.
76. Holway, A. H., Kim, S. H., La Volpe, A., and Michael, W. M. (2006). *J. Cell Biol* **172**, 999-1008.
77. Stergiou, L., Doukometzidis, K., Sendoel, A., and Hengartner, M. O. (2007). *Cell Death and Differentiation* **14**, 1129-1138.
78. Schumacher, B., Hofmann, K., Boulton, S., and Gartner, A. (2001). *Current Biology* **11**, 1722-1727.
79. Schumacher, B., Schertel, C., Wittenburg, N., *et al.* (2005). *Cell Death and Differentiation* **12**, 153-161.
80. Greiss, S., Hall, J., Ahmed, S., and Gartner, A. (2008). *Genes & Development* **22**, 2831-2842.
81. Yang, M., Sun, J., Sun, X., *et al.* (2009). *PLoS GENETICS* **5**, 1-14.

82. Sahoo, T., Johnson, E. W., Thomas, J. W., *et al.* (1999). *Hum. Mol. Genet.* **8**, 2325-2333.
83. Hirose, T., and Horvitz, H. R. (2014). *PLoS GENETICS* **10**, 1-14.
84. Keeney, S., Giroux, C., and Kleckner, N. (1997). *Cell* **88**, 375-384.
85. Rinaldo, C., Bazzicalupo, P., Ederle, S., *et al.* (2001). *Genetics* **160**, 471-479.
86. Lui, D. Y., and Colaiácovo, M. P. (2013) Meiotic Development in *Caenorhabditis elegans*. in *Germ Cell Development in C. elegans* (Schedl, T. ed.), Springer, New York. pp 133-170.
87. Cheng, Z., Tian, H., Chua, H., *et al.* (2014). *Toxicology Letters* **225**, 413-421
88. Wolke, U., Jezuit, E. A., and Priess, J. R. (2007). *Development* **134**, 2227-2236.

### Semblanza de la Dra. Rosa Estela Navarro González



La Dra. Rosa Estela Navarro González es bióloga de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realizó un Doctorado en Ciencias Bioquímicas en la Facultad de Química de la misma casa de estudios y obtuvo la medalla *Alfonso Caso* por ser la mejor estudiante de Doctorado de su generación. Su estudios doctorales consistieron en la regulación de genes antioxidantes durante la esporulación del hongo filamentos *Aspergillus nidulans*. De 1998 al 2002 realizó una estancia postdoctoral en la Escuela de

Medicina de Harvard en Boston, en la cual inició sus estudios acerca de las células germinales del *Caenorhabditis elegans*. Particularmente, trabajó con una proteína de unión a RNA que es importante para la fertilidad y sobrevivencia de este nematodo. En el 2002 regresó a México y se incorporó como Investigadora de tiempo completo del entonces Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Desde entonces ha profundizado en el estudio de las células germinales del nematodo particularmente en la respuesta que estas tienen ante condiciones de estrés. En el 2006, obtuvo una beca internacional otorgada por L'OREAL-UNESCO para mujeres en la ciencia. Con esta beca, la Dra. Navarro realizó una estancia de investigación como profesora visitante en la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins en Baltimore, en donde se

especializó en la metodología para hacer nematodos transgénicos. Entre las contribuciones relevantes del grupo de la Dra. Navarro están el descubrimiento de algunas vías de regulación que llevan a las células germinales del *C. elegans* a morir por apoptosis.





Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 145-164, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## EXPLORANDO LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL PARA LA OBTENCIÓN DE FÁRMACOS

### EXPLORING PLANT BIOTECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF MEDICINES

Villarreal María Luisa\*, Cardoso-Taketa Alexandre, Ortíz Anabel

Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
Av. Universidad 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca 62260, Morelos.  
Correo electrónico: luisav@uaem.mx Tel +52 777 3297057, Fax: +52 777 3297030

#### RESUMEN

Las plantas superiores son una fuente natural renovable para la obtención de compuestos que pueden ser utilizados como fármacos. Estos compuestos se acumulan (en bajas concentraciones), y su presencia y concentración varían de acuerdo a la especie vegetal y a condiciones ontogénicas y estacionales. Para la fabricación de productos herbolarios de alta calidad, es necesario estandarizar la materia prima vegetal en su contenido de metabolitos farmacológicamente activos. La biotecnología proporciona herramientas metodológicas muy útiles a través del cultivo de células y de tejidos vegetales para producir los compuestos activos de las plantas de manera homogénea y controlada; así como para incrementar su acumulación en relación a las plantas silvestres. El análisis computacional de los perfiles metabólicos de las plantas ofrece un camino innovador para la

estandarización de los extractos vegetales ya que facilita la detección simultánea y rápida de un amplio rango de compuestos en un momento del desarrollo de una planta. México es poseedor de una gran biodiversidad vegetal, y las plantas medicinales ocupan un lugar preponderante en las prácticas médicas tradicionales de un amplio sector de la población. Se presenta la investigación científica de la planta *Galphimia glauca* productora de compuestos sedantes y ansiolíticos. Este estudio ilustra los beneficios de realizar un trabajo experimental multidisciplinario con enfoque en la biotecnología, en la investigación de una planta endémica de México.

**Palabras claves:** cultivos *in vitro*, metabolómica, plantas medicinales, biotecnología

### ABSTRACT

Higher plants are an important source of chemical compounds which can be used as drugs. In wild plants, they are produced in very small amounts and their synthesis depend on genetic factors and environmental conditions. For the quality control of medicines obtained from plants, it is necessary to standardize the plant raw material, and to increase the production levels of the active compounds. Biotechnology offers novel procedures to adequately exploit the medicinal flora by using *in vitro* cultures systems that include plant cells, tissues and organs able to produce the active compounds. *In silico* procedures as metabolic profiling constitute leading technologies for the analysis of plant extracts providing a fast and simultaneous detection of a high number of metabolites. México occupies the fourth place in plant diversity, and herbal medicines are widely used for health-care needs. We present the scientific investigation of the Mexican species *Galphimia glauca* which produces important sedative and anxyolitic metabolites. This study reflects the benefits of a multidisciplinary project focused in biotechnological procedures for the study of native plants from México.

**Keywords:** *in vitro* cultures, metabolic profiling, medicinal plants

### INTRODUCCIÓN

La biotecnología constituye sin lugar a dudas una de las tecnologías dominantes del presente siglo. A lo largo de las tres últimas décadas la biotecnología ha ofrecido avances significativos encaminados a enriquecer un amplio espectro de actividades humanas, habiendo impactado en las áreas de salud, agricultura, producción de alimentos, biocombustibles y de protección al

medio ambiente. Recientemente, como resultado de algunos procesos biotecnológicos innovadores, una bio-economía sustentable ha empezado a emerger de manera importante en todo el mundo.

La biotecnología agrícola y vegetal es una de las áreas con mayor expansión en los últimos años, lo que sobretodo ha sucedido en los países industrializados. La llamada *biotecnología verde* integra un rango amplio de procedimientos que incluyen multiplicaciones clonales, cultivos *in vitro* de células/tejidos, y diversas técnicas de ingeniería genética que permiten la introducción de genes quiméricos en las plantas. El desarrollo de la biotecnología agrícola y vegetal ha implicado la observación constante de su aplicación relacionada a la inocuidad de sus productos en la salud humana y animal, así como su impacto en el medio ambiente y en la diversidad biológica.

La aplicación comercial más importante de la biotecnología vegetal ha sido la micropropagación de plantas seleccionadas para generar vitroplantas élites genéticamente idénticas. Otra tecnología con un potencial de aplicación importante se refiere al cultivo de células y órganos vegetales en medios líquidos, que posteriormente son escalados a volúmenes mayores para la producción controlada de metabolitos secundarios vegetales con importancia económica, entre los que se pueden considerar colorantes, saborizantes, plaguicidas y fármacos.

### **La investigación de fármacos vegetales: un trabajo multidisciplinario**

Los metabolitos de origen vegetal con actividad farmacológica se encuentran en concentraciones pequeñas en las plantas de origen, son de bajo peso molecular, y presentan una gran heterogeneidad química. El estudio científico de las plantas medicinales requiere de la participación de varias disciplinas para lograr integrar los perfiles químicos completos de una especie, e identificar aquellos compuestos que ejercen una actividad farmacológica específica. La etnobotánica es la disciplina que estudia e identifica las plantas de amplio uso popular para tratar ciertos padecimientos, y por ello nos orienta en la selección de las poblaciones de plantas a estudiar. Los ensayos farmacológicos que utilizan tanto modelos *in vitro* como modelos *in vivo*, permiten confirmar las actividades farmacológicas atribuidas a las plantas, de las cuales se estudian sus extractos, fracciones, o bien los compuestos puros. La fitoquímica es la disciplina que se encarga de investigar los compuestos presentes en las plantas, y para ello se utilizan habitualmente procedimientos cromatográficos especializados que permiten su aislamiento y purificación, para más adelante elucidar su estructura

usando técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales como son la resonancia magnética nuclear o la cristalografía de rayos X. La información anterior resulta fundamental para realizar estudios clínicos controlados donde se pueda establecer la dosis, la actividad y la seguridad de un medicamento de origen vegetal estandarizado. La participación de otras disciplinas de frontera como son la biología molecular, la biotecnología, la fisiología molecular y la biología de sistemas entre otras, está permitiendo elucidar los mecanismos de acción de los fármacos de origen vegetal, establecer las rutas metabólicas de su síntesis, y diseñar procedimientos para lograr la producción controlada de los principios activos.

Recientemente se han desarrollado tecnologías modernas de análisis fitoquímico como la metabolómica, lo que ha permitido la identificación de metabolitos secundarios de origen vegetal, y el descubrimiento de nuevas sustancias orgánicas con importancia económica. La aplicación de estas tecnologías permite identificar y comparar metabolitos secundarios de interés farmacológico en especies vegetales silvestres, así como en sus correspondientes variedades cultivadas *in vitro* o transformadas genéticamente [1].

Una vez identificados los compuestos vegetales con valor agregado, es posible la aplicación de procedimientos biotecnológicos que permitan la producción dirigida, homogénea y controlada de los compuestos de interés. Un enfoque multidisciplinario en la investigación de plantas empleando cultivos *in vitro* de células/órganos y técnicas fitoquímicas avanzadas, ha permitido la producción controlada de compuestos puros, la biotransformación de sustratos y la producción de nuevos productos que no son acumulados en las plantas silvestres. Los cultivos celulares creciendo en medios líquidos, son susceptibles a ser escalados en biorreactores.

A la fecha, son pocos los procedimientos que utilizan células u órganos vegetales que se han establecido en una escala comercial. Algunos ejemplos se refieren a la producción de los colorantes chiconina y purpurina [2,3] y de compuestos con valor medicinal como son la berberena, sanguinarina, gingenósidos y el taxol [4,5]. Aun cuando existen diversos problemas asociados a estos cultivos, su aplicación ofrece ventajas importantes para lograr una producción controlada y permanente de los compuestos de interés, misma que no está sujeta a las variaciones geográficas y/o ambientales en las que vive la planta de origen. Estos cultivos además brindan la posibilidad de proteger al ecosistema, evitando la sobre-explotación de algunas especies vegetales.

### **Cultivos *in vitro* de células, tejidos y células vegetales**

El empleo de procedimientos de “cultivo *in vitro*” ha permitido crecer células, tejidos y órganos provenientes de las plantas, en condiciones controladas de laboratorio. Estos procedimientos integran un conjunto de metodologías especializadas usadas para cultivar el material vegetal en forma estéril, con medios nutritivos sólidos o líquidos, a los que se les adicionan reguladores de crecimiento vegetal. Utilizando estos cultivos, se ha logrado producir de manera homogénea y controlada algunos compuestos de alto valor agregado que habitualmente se encuentran en la planta de origen. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ofrecer muchas ventajas para la producción de los compuestos activos, entre las que se pueden mencionar las siguientes: 1) un suplemento continuo de compuestos en forma óptima y bajo condiciones controladas; 2) la independencia de factores climáticos y de plagas presentes en plantas silvestres; 3) la propagación de especies con crecimiento muy lento o que se encuentran en peligro de extinción; y 4) la acumulación de compuestos que no se han podido identificar en la planta de origen. Por otro lado, y al ser los cultivos *in vitro* sistemas altamente controlados, éstos pueden constituir modelos adecuados para realizar investigaciones bioquímicas y fisiológicas que ayudan a entender el metabolismo secundario de las plantas; así como a investigar aspectos básicos sobre sus mecanismos de especialización o diferenciación. Actualmente, algunos de los cultivos vegetales más utilizados en investigación y producción de fármacos son los cultivos de callos, de células en suspensión y de raíces transformadas (Fig. 1).

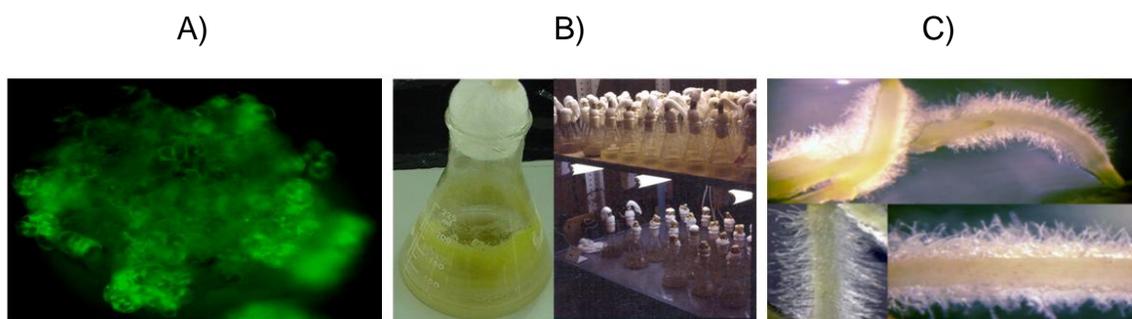


Fig. 1 Algunos cultivos vegetales *in vitro*: A) callos, B) células en suspensión C) raíces transformadas

### **Cultivos de callos**

Los callos son agregados de células no diferenciadas en división, que crecen en medios semisólidos conteniendo carbohidratos, sales minerales,

vitaminas y aminoácidos. Estos cultivos son suplementados con reguladores de crecimiento vegetal del tipo de auxinas y citoquininas que son responsables de mantener el crecimiento no diferenciado. Los callos crecen bajo condiciones estériles y usualmente se inducen a partir de los tejidos jóvenes de la planta. En teoría es posible obtener callos de todas las especies vegetales. Sin embargo, las condiciones óptimas para su crecimiento dependen de cada especie y requieren de ser investigadas. Los callos pueden variar en su textura; desde duros y compactos, a tejidos friables. Los tejidos callosos constituyen el material primario para más adelante establecer cultivos de células en suspensión.

### **Cultivos de células en suspensión**

Los cultivos de células en suspensión se establecen a partir de callos friables finamente fragmentados que son transferidos a medios nutritivos líquidos conteniendo reguladores de crecimiento vegetal, creciendo bajo condiciones controladas de iluminación (obscuridad, luz continua, o fotoperíodo) y temperatura (25 a 28°C). Los cultivos en suspensión crecen en agitación continua utilizando agitadores orbitales, que permiten un suplemento adecuado de nutrientes y oxígeno disuelto a las células en cultivo. Las suspensiones celulares pueden variar desde células monodispersas muy finas, hasta grandes agregados celulares. El tamaño de los agregados dependerá de la especie vegetal, el tiempo de cultivo y el régimen hormonal implementado. Las suspensiones celulares se subcultivan a medios nuevos con regularidad, y en el transcurso de los subcultivos se pueden presentar cambios en el número cromosómico y estabilidad en la producción de los metabolitos secundarios. Diversos factores nutricionales, físico-químicos y hormonales, pueden jugar un papel crucial en la optimización de la producción de los compuestos de interés. Aun cuando es requisito solucionar diversos problemas relacionados con estos cultivos, los procesos industriales actuales para la producción de metabolitos de origen vegetal, se basan en este tipo de cultivos.

### **Cultivos de raíces transformadas**

Los cultivos de raíces transformadas comprenden cultivos altamente diferenciados que potencialmente producen una mayor concentración de compuestos secundarios. Las raíces transformadas crecen en ausencia de reguladores vegetales y generalmente se obtienen por transformación genética a través de genes contenidos en plásmidos de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*, que es un parásito habitual de plantas dicotiledóneas. Se ha demostrado que estos cultivos poseen una mayor capacidad de biosíntesis de algunos metabolitos secundarios, ofreciendo de esta manera, un repertorio más amplio de producción de compuestos naturales al compararse con cultivos

indiferenciados como son los callos y células en suspensión de las mismas especies vegetales [6]. Se ha observado que muchos compuestos se encuentran en concentraciones más altas en los cultivos diferenciados [7]. Sin embargo, un problema importante que presentan los cultivos de órganos, se refiere a sus velocidades de crecimiento que son menores al ser comparadas con aquellas observadas en cultivos no diferenciados [8]. La transformación genética de tejidos y órganos puede en muchas ocasiones, aumentar la velocidad de crecimiento de los mismos, obteniéndose valores que se pueden comparar a los observados en cultivos de células no diferenciadas en suspensión [9]. Así, la transformación genética de plantas es un procedimiento que puede ser utilizado para aumentar la velocidad de crecimiento y la síntesis de metabolitos secundarios vegetales, una vez establecidos los sistemas de cultivo y de regeneración. En estos cultivos es posible introducir información genética quimérica a las plantas, para incrementar la biosíntesis de algunas enzimas que participan en las rutas metabólicas asociadas a estos metabolitos, así como inhibir o reducir la acción enzimática de rutas colaterales que pudieran limitar la biosíntesis de algunos metabolitos deseados [10-12].

### **Cultivos en biorreactores**

El cultivo a gran escala de células y órganos vegetales se lleva a cabo en biorreactores, los cuales permiten un control más riguroso y mayor monitoreo de las condiciones de cultivo, en comparación con matraces en agitación. El criterio utilizado para la selección del biorreactor depende del tipo de cultivo a ser escalado: suspensión, tejido u órgano, libre o inmovilizado. Los biorreactores generalmente utilizados para cultivos libres en suspensión son los tanques agitados, airlift, columna burbujeadora y tambores rotatorios [13]. La eficiencia de los biorreactores se evalúa considerando su capacidad de transferir oxígeno disuelto, el estrés hidrodinámico generado, la eficiencia de mezclado, su efecto en el tamaño de los agregados, la habilidad para controlar la temperatura y el pH, así como la posibilidad de operar en condiciones asépticas durante largos períodos de tiempo [13].

### **La metabolómica como una herramienta de análisis**

La metabolómica, es considerada la última de las ciencias “ómicas” después de la genómica (estudio del genoma) y proteómica (estudio del proteoma) es una disciplina que se encarga del análisis global del conjunto de metabolitos presentes en un sistema biológico. Estos conjuntos son muy amplios y pueden referirse a la composición de tejidos o de cultivos celulares de cualquier organismo. Se considera que la metabolómica es la herramienta de análisis del

futuro, ya que se puede aplicar en distintas áreas del conocimiento a nivel de ciencia básica y aplicada. Cada año el número de trabajos en metabolómica aumenta de forma exponencial. Los enfoques de la metabolómica son muy amplios y se aplican en el estudio de diagnóstico de enfermedades, como es el cáncer, en la nutrición (metabolómica nutricional), en toxicología, en el estudio de enfermedades metabólicas, en biorremediación, en el desarrollo de fármacos, en los procesos de ingeniería metabólica de bacterias, en la investigación de plantas medicinales, y en el estudio de procesos de producción de bebidas, como son el vino y la cerveza, entre otros [14,15].

La instrumentación para realizar un estudio metabolómico es muy diversa, ya que puede utilizar desde cromatógrafos de líquidos y gases acoplados a espectrometría de masas (LC/GC-MS-MS), hasta equipos más sofisticados como los espectrómetros de resonancia magnética nuclear. Generalmente estos equipos permiten detectar un número muy grande de metabolitos que intervienen en los procesos celulares y revelan cómo está funcionando el metabolismo en un órgano determinado [16]. Se estima que el número de metabolitos presentes en un organismo puede oscilar entre 3.000 y 20.000. Mientras la genómica y la proteómica indican lo que podría haber ocurrido, la metabolómica nos indica lo que realmente ha ocurrido o está ocurriendo. Es por esto que la metabolómica es la ciencia que mejor puede caracterizar los fenotipos de los seres vivos, y sus relaciones con el entorno de un organismo dado [17].

Las *ómicas* son ciencias *holísticas*, es decir, consideran el mayor número de variables posibles, para posteriormente extraer la información verdaderamente útil de ellas y trabajar en su conjunto. Debido a la gran dimensión de datos generados en el estudio de perfiles de sistemas biológicos, es necesario el procesamiento multivariado de la información para la reducción a escalas humanamente interpretables, a través de diferentes programas de análisis bioinformático. Podemos decir que la metabolómica se ha constituido en una técnica indispensable dentro de la *biología de sistemas*, ciencia multidisciplinar que se encarga del estudio sistemático de los flujos e interacciones en sistemas biológicos [18].

### **Aplicaciones de la metabolómica en plantas**

Los avances tecnológicos en el campo de la informática aplicada a sistemas biológicos han permitido el uso de herramientas modernas que ayudan a generar información valiosa sobre la evolución de los perfiles de producción de metabolitos secundarios al interior de una planta. Esta información puede utilizarse como un

excelente instrumento en el análisis de extractos vegetales con aplicaciones comerciales importantes, como es el caso de la industria farmacéutica y la alimentaria. La aplicación del análisis metabolómico en el estudio de los vegetales es relevante, y es posible utilizarla en aspectos tales como: el control de calidad de materias primas, en procesos industriales y en la elaboración de productos herbolarios terminados. Por otro lado, esta metodología de vanguardia, permitirá desarrollar las investigaciones básicas en farmacología, biotecnología y quimiotaxonomía de las plantas. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (RMN  $^1\text{H}$ ) de un extracto vegetal, permiten generar datos multi y megavariados, que resultan de la presencia de miles de metabolitos secundarios. La integración de estos datos se logra mediante un proceso estadístico conocido como Análisis del Componente Principal (PCA), que reduce los datos y los procesa en función de sus similitudes y diferencias.

Las técnicas basadas de espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$  han sido empleadas como una alternativa para resolver las anteriores demandas. Los registros de RMN  $^1\text{H}$  de alta resolución, combinados con el análisis quimiométrico, ofrecen un camino innovador para el análisis de extractos vegetales. Estas técnicas facilitan la rápida detección de un amplio rango de metabolitos primarios y secundarios en un determinado momento del desarrollo de una planta. Un gran número de compuestos químicos presentes en el extracto pueden ser analizados simultáneamente para definir un perfil metabólico de la planta, que se conoce como “huella dactilar metabólica”. Estas huellas dactilares generan combinando los registros de resonancia magnética nuclear de protones (RMN  $^1\text{H}$ ) y los análisis estadísticos multivariados, que tienen como objetivo, disminuir la complejidad de los datos obtenidos y detectar el patrón metabólico de los extractos analizados. Estos patrones químicos, finalmente reflejan los cambios relacionados con el medio ambiente o con variaciones genéticas en el perfil de metabolitos de una planta [19].

El PCA es el resultado de la combinación lineal de las variables originales graficadas de forma ortogonal entre sí. Este método condensa los datos multivariados en un número reducido de componentes principales que describen la gran variabilidad de la muestra. Aplicando esta técnica a los datos obtenidos a partir de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de extractos crudos vegetales, es posible describir gráficamente las similitudes y diferencias entre muestras de interés, usando planos o espacios tridimensionales [20]. Este tipo de análisis ha sido usado extensamente en toxicología, en adulteración de jugos de frutas [21] y en la clasificación de remedios herbales [22], por citar algunas aplicaciones. Una de las posibilidades más fascinantes de la aplicación de la metabolómica basada en el

análisis de RMN  $^1\text{H}$  y PCA, es la predicción de la actividad biológica de un extracto vegetal. Las características quimiométricas de un extracto crudo pueden contener la información del patrón necesario para la interacción entre un sistema biológico y químico, que se refleja en la actividad farmacológica. En este sentido, se ha logrado crear un modelo de predicción de la actividad antiplasmódica contra el *Plasmodium falciparum* de diferentes extractos de *Artemisia annua*, a partir del análisis metabólico y de la clasificación mediante regresión por mínimos cuadrados (PLS-DA) [22]. De la misma manera, la investigación metabólica de la planta mexicana *Galphimia glauca*, que posee actividades ansiolítica y sedante, demostró la importancia de este tipo de análisis, donde fue posible discriminar claramente las poblaciones activas de las inactivas con base en el contenido metabólico de sus extractos crudos [23]. Los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo con esta especie se detallan más adelante.

### **Herbolaria en México**

México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en cuanto a diversidad vegetal, además de contar con una gran riqueza en flora medicinal. El uso de las plantas medicinales en México representa un valioso elemento cultural que nos identifica como nación, y que ha sido resguardado durante siglos por los médicos tradicionales y por los habitantes de nuestros pueblos indígenas. Esta práctica se inició antes de la llegada de los españoles, y desde entonces ha jugado un papel notable en el combate de muchas enfermedades. Sin lugar a dudas, el testimonio más significativo de la medicina herbolaria de esa época está representado por el Códice de la Cruz Badiano, cuyo título en latín es *Libellus de medicinalibus indorum herbis* que significa "Libro de las Hierbas Medicinales de los Indios. Este texto que fue escrito en 1552 por el médico xochimilca Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, también xochimilca y estudiante del Colegio de Santa Cruz, es considerado como el primer *vademecum* que contiene la sabiduría herbolaria precolombina que fue heredada a los mexicanos (Aguirre Beltrán y Moreno de los Arcos, 1990). Además de ilustrar con gran belleza las plantas medicinales de esa época, proporciona fórmulas de aplicación, ingredientes y dosis para el tratamiento de diferentes enfermedades. Actualmente, de acuerdo con los reportes del Herbario de Plantas Medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social, existen más de 6000 especies de plantas medicinales que son utilizadas por amplios sectores de la población (Aguilar Contreras y Martínez Alfaro, 1993). Es evidente que el uso de las plantas medicinales desde el México prehispánico hasta nuestros días, es una práctica que ha tenido gran relevancia en los esquemas de salud pública de nuestro país. Sin embargo, la preparación y administración de las plantas con propósitos

curativos, usualmente se realiza sin control de calidad y sin estandarización de la materia prima vegetal. Es necesario realizar investigaciones científicas que permitan la identificación adecuada de los metabolitos activos en las plantas, así como desarrollar procedimientos tecnológicos que promuevan su producción incrementada.

### Investigación de la planta mexicana *Galphimia Glauca*

Nuestro grupo de investigación del Laboratorio de Plantas Medicinales del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos ha realizado investigación científica básica y biotecnológica de la planta mexicana *Galphimia glauca* (Cav) Kuntze de la familia Malpighiaceae. Estos estudios abordan la identificación química de los principios activos, el cultivo *in vitro* (empleando células, tejidos y órganos), y el análisis metabolómico de esta especie que se distribuye en varios estados de la República Mexicana y, en la que se han documentado sus efectos sobre el Sistema Nervioso Central. Inicialmente realizamos estudios que integran aspectos fitoquímicos y farmacológicos de esta planta endémica de México. Se aislaron y elucidaron los principios biodinámicos de *G. glauca* que corresponden a una familia de nueve triterpenos del tipo de los nor-secofridelanos que han sido denominados como galfiminas A-I (Fig. 2), y que presentan una potente actividad sedante y ansiolítica [24]. Dichas actividades han sido demostradas en diversos modelos celulares y animales, así como en estudios clínicos realizados en humanos [25]. Las galfiminas se acumulan en concentraciones pequeñas en las plantas silvestres, y su concentración varía notablemente de acuerdo a la edad de la planta y a factores estacionales.

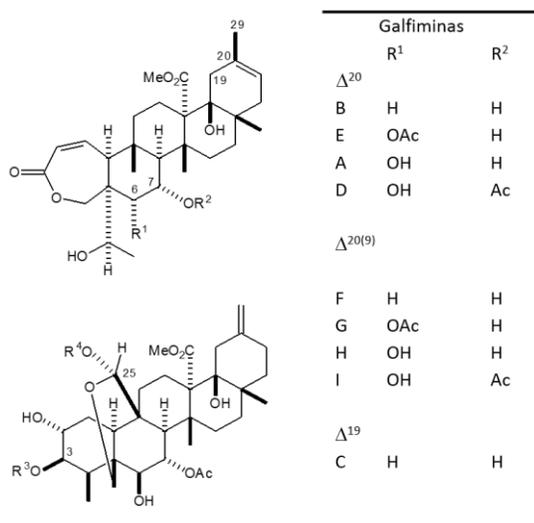


Figura 2. Estructura química de los compuestos sedantes galfiminas (A-I).

### Cultivos *in vitro*

Con el propósito de establecer modelos de producción controlados de las galfiminas que sirvan para el estudio de sus rutas biosintéticas, iniciamos cultivos *in vitro* de callos de *G. glauca* que fueron capaces de sintetizar galfimina B (el compuesto mayoritario) con un rendimiento similar a la planta silvestre, así como cultivos de células en suspensión en los que se logró un rendimiento superior en 36% de la galfimina B [26]. Sin embargo, y a pesar de que la acumulación del principio sedante bajo estas condiciones experimentales es del mismo orden de magnitud que el observado en la planta silvestre, éstos valores continúan siendo bajos para lograr su escalamiento industrial. Más adelante, y con la intención de establecer genotipos estables, iniciamos cultivos de raíces transformadas, al inocular explantes estériles con la cepa bacteriana ATCC 15834 de *A. rhizogenes*. Los explantes infectados se sembraron en un medio nutritivo sólido y se incubaron en condiciones controladas de luz y temperatura. Después de diez a doce subcultivos diarios consecutivos, emergieron las raíces, y transcurridas nueve semanas de la inoculación, se observó el crecimiento de raíces pilosas, es decir la aparición de raíces cubiertas de pelo [27]. También se establecieron cultivos de raíces en medios líquidos que fueron mantenidos en agitación, los cuales presentaron un crecimiento abundante (Fig. 3), después fueron subcultivados hasta que se realizó la cosecha de las biomásas y la separación de sobrenadantes

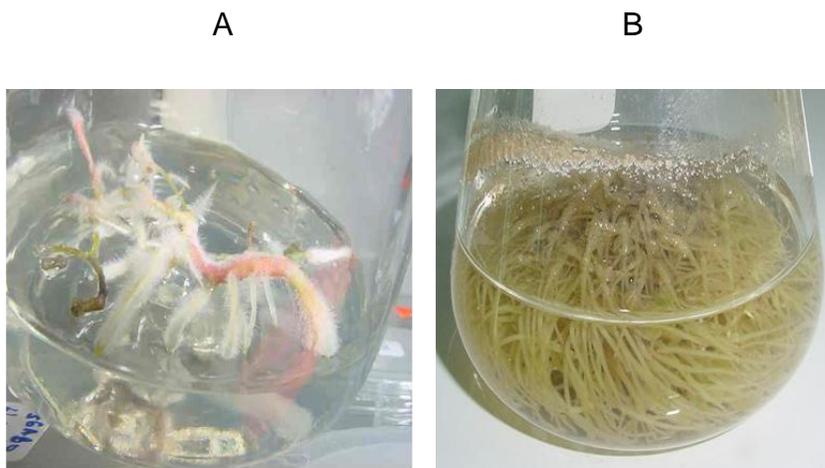


Figura 3. Raíces pilosas de *Galphimia glauca* creciendo en medio sólido (A) y en medio líquido (B).

### **Aislamiento y elucidación de compuestos sedantes producidos por cultivos de raíces transformadas.**

A partir de las biomásas de raíces fue posible aislar el principio sedante galfimina B, que fue identificado utilizando métodos cromatográficos convencionales y cuya concentración fue del mismo orden de magnitud que el de la planta silvestre. Adicionalmente, del medio líquido se aislaron tres compuestos de estructura novedosa que fueron purificados mediante cromatografía líquida de alta presión y elucidados mediante la aplicación de resonancia magnética nuclear. Los resultados obtenidos permitieron concluir que los nuevos compuestos son triterpenos que se enmarcan en el tipo de nortriterpenos derivados del friedelano y que guardan una similitud estructural muy cercana con las galfiminas sedantes obtenidas de la planta de origen. Estos compuestos fueron denominados como glaucacetalinas A–C [27]. En un trabajo posterior utilizando callos que emergieron del cultivo de raíces, se aisló la cuarta glaucacetalina [28]. Utilizando un ensayo practicado en ratones, se comprobó que estas glaucacetalinas poseen una actividad sedante tan potente como las galfiminas obtenidas a partir de la planta [28]. Es importante señalar que las glaucacetalinas nunca han sido identificadas en la planta silvestre, lo que indica que es probable que las condiciones de cultivo y de transformación, propicien favorablemente su síntesis. Por otro lado, la excreción de las glaucacetalinas al medio de cultivo en el que se encuentran creciendo las raíces, facilita su recuperación, y permite una mayor producción de dichos compuestos sedantes.

### **Análisis metabólico**

Los estudios científicos de *G. glauca* referidos en párrafos anteriores se realizaron con ejemplares de la planta colectados en el municipio de Doctor Mora, en el Estado de Guanajuato. Como también fue previamente indicado, esta especie crece en varios estados de la República Mexicana, y las poblaciones naturales que habitan en estas entidades no habían sido investigadas en relación a la presencia de compuestos activos. Con el propósito de realizar un análisis comparativo y sentar las bases para realizar un control de calidad adecuado de los extractos de la planta, se diseñó un estudio metabólico que permitió un análisis global de los extractos crudos de *G. glauca* recolectada en seis localidades distintas de la República Mexicana. Para realizar este trabajo pionero se colectaron individuos de las siguientes localidades: Doctor Mora, Gto. (GM); Jalpan de Serra, Qro. (QJ); Guadalajara, Jal. (JG); Cuernavaca (MC), San Andrés de la Cal (MS), y Tepoztlán (MT), Mor., con un mínimo de 6 individuos por sitio de recolección, lo que resultó en un total de 39 muestras. Una muestra de cada localidad fue autenticada y depositada en el Herbarium HUMO-CEAMISH. A

partir de las hojas, se prepararon extractos de cada muestra utilizando disolventes deuterados para el registro de espectros de RMN<sup>1</sup>H. Para la obtención del perfil metabólico mediante PCA y análisis discriminario de mínimos cuadrados (PLS-DA), se empleó el programa SIMCA-P 11.0, Umetrics [23]. En la figura 4 se observa claramente una discriminación entre las diferentes poblaciones analizadas. Es importante señalar que el posicionamiento de cada extracto crudo en la gráfica PC-1 vs. PC-2 dependió de las señales de RMN<sup>1</sup>H que generaron cada muestra y su relación con las señales de los otros 36 extractos. Las señales de RMN<sup>1</sup>H de las galfiminas fueron las cruciales en la diferenciación de las poblaciones GM y QJ de las demás (lado derecho de la figura 4).

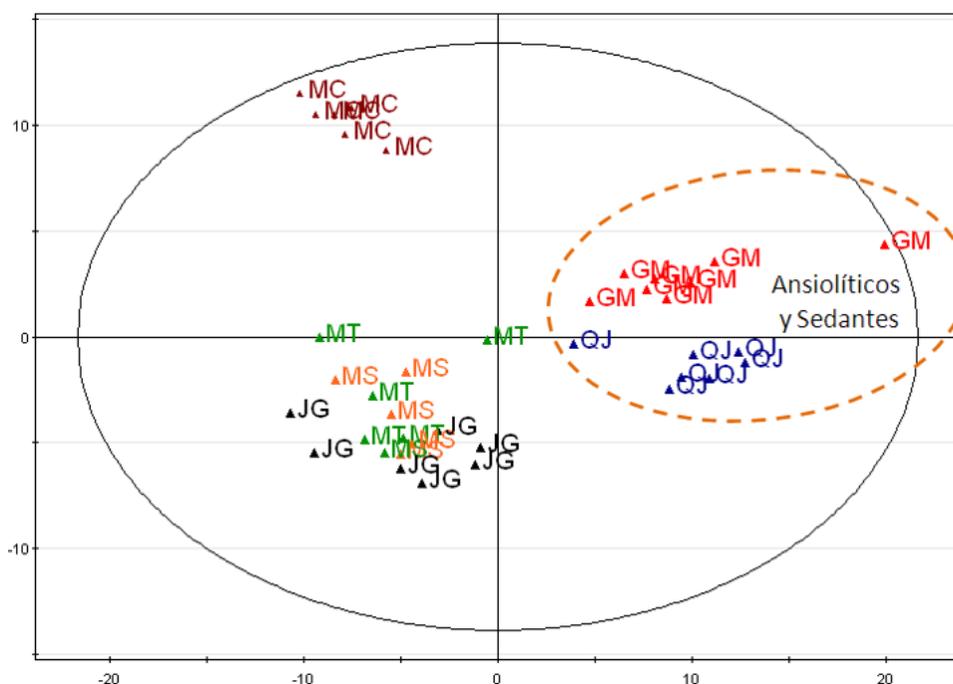


Figura 4. Perfil metabólico *in silico* de los extractos activos GM (Dr. Mora, Guanajuato) y QJ (Jalpan, Querétaro) que se relacionan con la presencia de galfiminas; y de los extractos MC (Cuernavaca, Morelos), MS (San Andrés de la Cal, Morelos), MT (Tepoztlán, Morelos) y JG (Guadalajara, Jalisco).

#### Actividades farmacológicas en seis poblaciones de *G. glauca*

El perfil metabólico basado en los espectros de RMN<sup>1</sup>H y análisis por PCA sugirió entonces que las diferencias químicas obtenidas entre las poblaciones podrían tener un impacto directo en las actividades farmacológicas. Las evaluaciones farmacológicas de los extractos crudos de dichas poblaciones se

llevaron a cabo en ratones de laboratorio utilizando el modelo de la cruz elevada y el modelo de la potenciación de hipnosis por barbituratos [29], los cuales son los ensayos neurofarmacológicos validados para medir actividades ansiolíticas y sedantes respectivamente. El modelo de la cruz elevada mide los niveles de ansiedad en un ratón en un nuevo ambiente de exploración, con la expectativa de que los ratones no tratados permanecerán más tiempo en los brazos cerrados de la cruz elevada que en los brazos abiertos. El modelo de hipnosis inducida por pentobarbital permite registrar el tiempo de duración del sueño que se potencializa en presencia de una sustancia con actividad sedante. Al utilizar el ensayo de ansiedad se observó una diferencia significativa entre los animales inyectados con vehículo y aquellos inyectados con diazepam (control positivo), en relación al porcentaje de permanencia en los brazos abiertos. Con relación a los extractos evaluados, solamente los provenientes de GM y QJ se mostraron activos. El modelo de sedación indicó que las muestras GM y QJ presentaron valores de actividad estadísticamente diferentes al vehículo, siendo que la muestra MT se consideró con actividad intermedia (Fig. 5). Los resultados anteriores son acordes con el análisis metabólico aplicado a estas poblaciones, lo que indicó que sólo las poblaciones GM y QJ contienen las galfiminas. Con el propósito de demostrar una correlación mutua directa entre el perfil metabólico y las actividades ansiolítica y sedante, se empleó un método de análisis multivariado supervisado mediante análisis discriminario del modelado de regresión de los mínimos cuadrados (PLS-DA). Los resultados de dicho análisis indicaron que las señales de RMN<sup>1</sup>H de las galfiminas contribuyeron en forma decisiva para dicha discriminación, resultando en una máxima separación entre poblaciones activas e inactivas (Fig. 6).

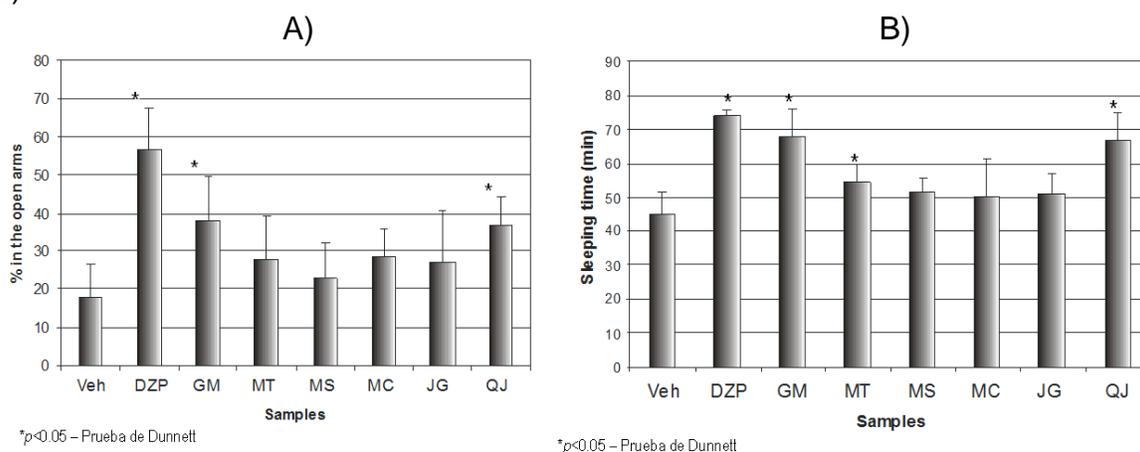


Figura 5. Prueba de la cruz elevada (A) y prueba de potenciación del sueño (B) por barbituratos para determinar el efecto ansiolítico y sedante respectivamente, de diferentes poblaciones de *Galphimia glauca*.

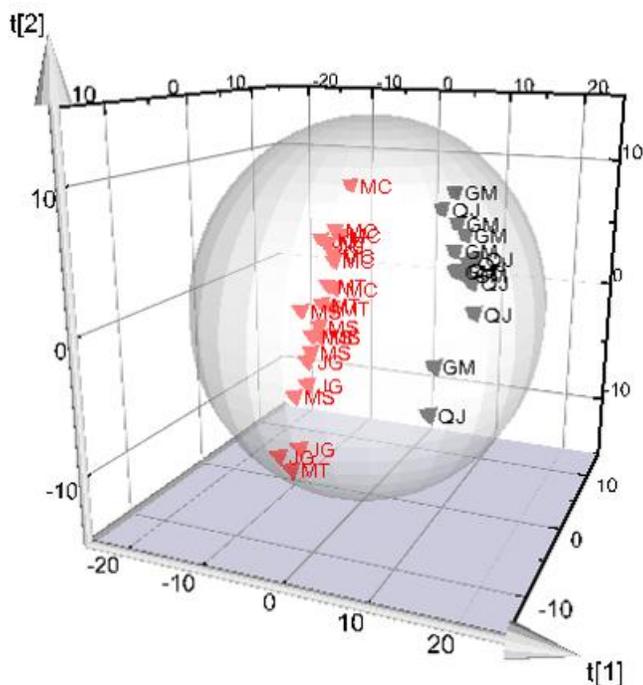


Figura 6.-Análisis PLS-DA en 3D de extractos de *Galphimia glauca*. Agrupamiento a la izquierda: extractos inactivos; y a la derecha: extractos con actividad ansiolítica.

### Identificación de galfiminas

La identificación y cuantificación de las galfiminas se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Los cromatogramas que se presentan en la figura 7 indican la presencia de galfiminas solamente en las poblaciones recolectadas en GM y en QJ, estando ausentes en las plantas de las demás localidades. Las muestras de Guanajuato (GM) presentaron un promedio de 6.58 mg de galfiminas (picos I-V) por gramo de peso seco de hojas, rendimiento mayor que los 5.66 mg/g PS de galfiminas presentes en el material de Querétaro (QJ) [23].

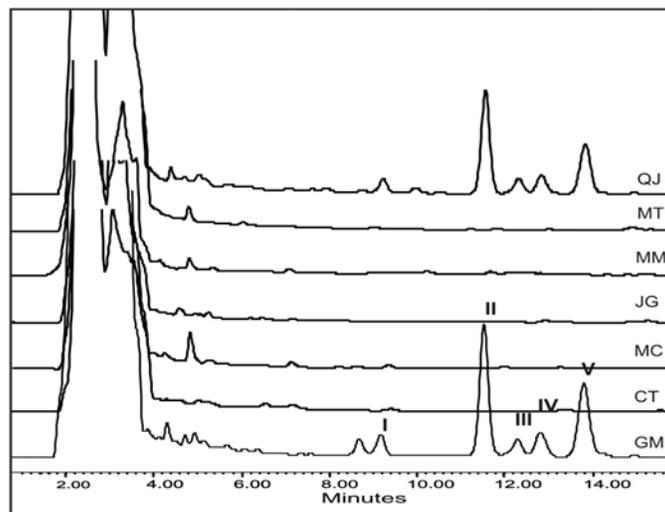


Figura 7.- Análisis cromatográficos por “Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia” de diferentes poblaciones de la planta *Galphimia glauca*

Los resultados obtenidos mediante el análisis metabólico realizado en diferentes poblaciones de *G. glauca* subrayan la necesidad de estandarizar las materias primas vegetales para la producción de productos herbolarios y fitomedicamentos, ya que el contenido de metabolitos en una planta puede variar notablemente en función del sitio de recolección o de sus características ontogenéticas. Las investigaciones con *G. glauca* representan el primer estudio metabólico de una planta mexicana utilizando RMN y análisis multivariado. El enfoque de este trabajo permitió diferenciar poblaciones con contenidos variables de principios activos que se correlacionan con los datos farmacológicos. Las tecnologías utilizadas en esta investigación están enfocadas a lograr la estandarización adecuada y el control de calidad en la producción de un fitomedicamento a base de una especie autóctona de México.

## BIBLIOGRAFIA

1. Villarreal, M.L., Alvarez, L., Quintero, R. *Solanum crhysostrichum* (Schdl): Distribution, identification of the antifungal saponin SC1, in vitro propagation, cell suspension cultures, large scale production of SC1. En: Nagata, T.; Ebizuka, Y., eds., *Biotechnology in agriculture and forestry. Medicinal and aromatic plants XII*, Vol 51, Berlin, Springer-Verlag, 2002 .P. 252–267
2. Fujita, Y., Tabata, M., Nishi, A., y Yamada, Y. *Plant Tissue Culture*. Tokyo, Japan: Ed. Maruzen Co. LTd; 1982.
3. Peterson, M., Alferman, A. *Biotechnology*. New York, Tokyo, Japan. Ed. VCH. Weinheim. 1993.

4. Fujita, Y. En: John Wiley & Sons editors. Applications of plant cell and tissue culture, Chichester, Ciba Foundation Symposium 1998. P. 228-238.
5. Payne, G., 1991 En: Hansen Publisher editor. Plant cell tissue and organ culture in liquid systems. Munich Germany; 1991. P.177-224.
6. Giri, A.; Narasau, L.M. (2000) *Biotechnol Adv.***18**, 1–22.
7. Zárate, R. (2000) *Plant Cell Rep.* **19**, 418–423.
8. Villalobos-Amador, E., Rodríguez-Hernández, G. y Pérez-Molphe-Balch, E. (2002) *Plant Cell Rep.* **20**, 779–785.
9. Yang, D.C. y Choi, Y.E. (2000) *Plant Cell Rep.* **19**, 491–496.
10. Bajaj, Y.P.S. Ishimaru, K., En Bajaj Y: P: S eds. Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin:Springer, Berlag;1999. P. 1–176.
11. Hansen, G., y Wright, M.S. (1999) *Trends Plant Sci.* **4**, 226–231.
12. Ramachandra, S.y Ravishankar, G.A. (2002). *Plant. Cell. Cult.* **20**,101–153
13. Panda, A.K., Mishra, S., Bisaria, B.S. y Bhojwani, S.S. (1989). *Enz. Microb. Technol.* **11**, 287–397
14. Schmidt C.W. Metabolomics: What's happening Downstream of DNA, Environmental Health Perspectives. 2004
15. Lindon, J.C.,Nicholson, J.K y Holmes.E. Handbook of Metabonomics and Metabolomics. Ed.Elsevier; 2007.
16. Lindon,J.C.y Nicholson.J.K.(2008) *Ann. Rev. Analyt.. Chem.***1**, 45- 69.
17. X Correig, X. Introducción a la metabolómica. 2009.  
[http://www.institutoroche.es/nuevasVias/41/Introduccion a la metabolómica](http://www.institutoroche.es/nuevasVias/41/Introduccion%20a%20la%20metabolomica)  
Xavier Correig.
18. Wishart D.S. (2008) *Drugs* **9**, 307-322.
19. World, S., Esbensen, K.;y Geladi, P.(1987) *Chemom. Intel. Lab.* **2**, 37–52.
20. Wang,Y.,Tang, H., Nicholson, J.K., Hylands, P.J., Sampson, J., Withcombe, I.,Stewart, C.G., Caiger, S., Oru, I., y Holmes, E. (2004) *Planta Med.* **70**, 250–255.
21. Voguels, J.T.W.E., Terwel, L., Tas, A.C., Berg, F., Dukel, F.; y Greef, J. (1996) *J. Agr. Food Chem.* **44**, 175–180.
22. Bailey, N.J., Sampson, J., Hylands, P.J., Nicholson, J.K. y Holmes, E. (2002) *Planta Med.* **8**, 1–5
23. Cardoso-Taketa, A.T., Pereda-Miranda, R., Choi, Y.H., Verpoorte, R. y Villarreal, M.L. (2008) *Planta Med* **74**,1295–1301.
24. Cardoso-Taketa, A.T.; Lozada-Lechuga, J.; Fragoso-Serrano, M.; Villarreal, M.L.; y Pereda-Miranda, R. (2004). *J. Nat. Prod.*, **67**, 644–649
25. Herrera-Ruiz,M., Jiménez Ferrer,E., Avilés D., González-Cortasar, M., y Tortoriello J. (2006). *Phytomedicine*, **13**, 23-28.
26. Osuna, L., Pereda-Miranda, R. y Villarreal ML. (2002) *Biotech.Lett.* **24**:257-261
27. Nader,B., Cardoso-Taketa,A., Iturriaga, G., Pereda-Miranda, R., y Villarreal, ML: (2004). *Planta Méd.* **70**:1174-1179.
28. Ortiz, A., Cardoso-Taketa, A., Rodríguez-Monroy M., Arellano, A, Hernández G.,y Villarreal ML (2010). *Planta Med.***76**:386-392.

29. Sharma, A., Cardoso-Taketa, A., Choi, YH, Verpoorte R.y Villarreal ML. (2012) *J.Ethnopharmacol.* **141**:964-974.

### **Semblanza de la Dra. María L. Villarreal Ortega**



Investigadora Titular “C” de Tiempo Completo Definitivo y Jefe de Grupo en el Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel 3, miembro de la Academia Mexicana de Ciencias y de la Academia de Ciencias de Morelos. Completó sus estudios profesionales en la Universidad Nacional Autónoma de México y en la Universidad

Autónoma del Estado de Morelos, donde obtuvo los grados de Licenciada en Biología y Doctora en Biotecnología. Ha sido investigadora visitante de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Illinois en Chicago, el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos en Bethesda Maryland, la Universidad de Picardie Jules Verne en Amiens, Francia, y el Departamento de Farmacognosia de la Universidad de Leiden en los Países Bajos. Fue Presidenta de la Delegación Morelos de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (2006-2008) y Presidenta de la Mesa Directiva Nacional de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (2008-2010). Ha recibido diferentes distinciones como el Reconocimiento a la Excelencia Profesional del Gobierno del Estado de Morelos (2000), Premio Cambiotec (1998), Mención Honorífica en el Premio Canifarma y el Premio Mexwii 2006 otorgado por la Global Women Inventors and Innovators del Reino Unido, en la categoría de Universidades e Institutos de Investigación por su labor realizada en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. En 2013 recibió el Premio al Mérito Doctor Martín de la Cruz, otorgado por el Consejo de Salubridad General de la Secretaría de Salud del Gobierno Federal. Sus publicaciones incluyen 73 artículos científicos originales en revistas indizadas de divulgación internacional, 13 capítulos de libros y un libro.





Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 165-186, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## **RESISTENCIA A LA INSULINA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1**

### **INSULIN RESISTANCE IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS**

Ferreira-Hermosillo Aldo, Molina-Ayala Mario, Ramírez-Rentería Claudia, Mendoza-Zubieta Victoria.

Institución de procedencia: Servicio de Endocrinología y Unidad de Investigación en Endocrinología Experimental. Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.

e-mail: [aldo.nagisa@gmail.com](mailto:aldo.nagisa@gmail.com)

Teléfono: 56276900 ext. 21551

### **RESUMEN**

La DM1 es una enfermedad autoinmune en la cual las células  $\beta$  del páncreas son destruidas. Representa en la actualidad el 10% de los pacientes con diabetes mellitus y su incidencia se reporta hasta en 6.2 por 100,000 personas en nuestro país. Anteriormente, la mortalidad en estos pacientes estaba relacionada al desarrollo de complicaciones microvasculares y la esperanza de vida era corta; sin embargo, en la actualidad estos pacientes tienen mayor tasa de sobrevivida y presentan patologías relacionadas con la obesidad como son los componentes de síndrome metabólico. Esta condición es conocida como “doble diabetes” y es provocada por el desarrollo de resistencia a la insulina. Parece que los pacientes con doble diabetes tienen mayores alteraciones cardiovasculares debido al

desarrollo de complicaciones macrovasculares. A pesar de que se presenta hasta en el 44% de los pacientes, sus mecanismos fisiopatológicos son desconocidos.

El servicio de Endocrinología y la Unidad de Endocrinología Experimental en el Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI investigan el papel de la inflamación en el desarrollo de doble diabetes. A través de nuestra investigación, proponemos que la resistina (un marcador clásico de resistencia a la insulina en diabetes tipo 2), también puede ser utilizada para la detección de los pacientes con diabetes tipo 1 y síndrome metabólico.

**Palabras clave:** diabetes mellitus tipo 1, síndrome metabólico, citocinas

### **SUMMARY**

Type 1 diabetes mellitus is an autoimmune disease characterized by B cell destruction. It represents 10% of patients with diabetes and its incidence has been reported of 6.2 per 100,000 inhabitants in our country. Previously, the mortality in those patients was related to microvascular complications with a short lifespan. However, nowadays these patients have a higher survival rate and develop obesity-related pathologies such as metabolic syndrome components. This is also known as “double diabetes”. This entity is related to insulin resistance and it seems to increase cardiovascular adverse effects in patients due to the macrovascular complications. Despite it represents almost 44% of type 1 diabetes populations, exact physiopathological mechanisms remains unknown.

The Endocrinology Department and the Endocrinology Experimental Investigation Unit of Hospital de Especialidades, Centro Medico Nacional Siglo XXI is currently investigating the inflammatory profile in patients with double diabetes. We found that resistin (a classical marker of insulin resistance in type 2 diabetes) could also be used as a detection marker of insulin resistance in type 1 diabetes.

**Keywords:** type 1 diabetes, metabolic syndrome, cytokines

### **Resistencia a la insulina en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)**

La DM1 es una enfermedad autoinmune en la cual las células  $\beta$  del páncreas son destruidas ocasionando incapacidad para mantener las concentraciones adecuadas de insulina en respuesta a la ingestión de nutrientes [1]. En 1984, Sutherland y cols., trasplantaron la cola del páncreas de gemelos idénticos no diabéticos a sus gemelos enfermos de DM1. En contraste al resto de

los órganos trasplantados, sus islotes pancreáticos (no así el resto de las células acinares), fueron destruidos [2]. A partir de este momento, la DM1 se volvió una de las enfermedades autoinmunes más estudiadas y se ha designado como blanco prioritario para el desarrollo de vacunas por los Institutos Nacionales de Salud (NIH, National Institutes of Health) [3].

La incidencia global de la DM1 se ha incrementado en aproximadamente 3% por año en menores de 5 años y actualmente representa el 10 % de los pacientes con diabetes mellitus [4]. El estudio DIAMOND (*Multinational Project for Childhood Diabetes*), iniciado por la OMS en 1990 encontró que hasta el año 2000, la incidencia variaba de 0.1 casos/100,000 personas en Caracas, Venezuela, hasta 36.8 casos/100,000 personas en Cerdeña, Italia y en Finlandia, con un incremento veloz en los países con “incidencia baja” (definido como 1-4.99 casos/100,000 personas) [5]. En México, existen pocos estudios acerca de la incidencia y prevalencia de DM1. Uno de los primeros estudios identificó una incidencia de 0.58 casos por 100,000 habitantes para el periodo de 1984 a 1987 [6]. Por su parte, Aude-Rueda y cols., en un estudio en la población de Boca del Río, Veracruz, reportó una incidencia de 1.5/100,000 habitantes (IC 95% 0.75-1.70) entre 1978 y 1992 [7]. En una publicación reciente, Gómez-Díaz y cols. Reportaron la incidencia de DM1 en niños atendidos en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) entre los años 2000 a 2010. De acuerdo a los datos recabados por la Dirección de Prestaciones Médicas del IMSS, el número de casos nuevos en menores de 19 años, se incrementó significativamente de 3.4 a 6.2 por 100,000 personas ( $p < 0.001$ ) [8].

### **Diagnóstico**

Usualmente el diagnóstico de esta enfermedad se realiza de los 4-6 años y de los 10-14 años, con síntomas y signos de hiperglucemia (poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso) y más comúnmente en forma de cetoacidosis, constituyendo uno de los principales diagnósticos realizados en el departamento de urgencias en Pediatría. La confirmación se realiza al detectar la positividad de autoanticuerpos como:

GAD65: anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico

ICA521/IA: anticuerpos contra antígeno asociado a islote

IAA: anticuerpos contra insulina

ZnT8: anticuerpos contra transportador de zinc T8

Hasta el 90% de los pacientes con DM1 tienen al menos la presencia de un anticuerpo, siendo comúnmente detectados los anticuerpos antiGAD65 que persisten durante toda la enfermedad [4]. Por otra parte, se ha establecido que la presencia de un anticuerpo confiere un riesgo de 25% del desarrollo de la enfermedad a los 5 años, la presencia de dos anticuerpos de 39% de riesgo y de tres más del 75% de riesgo [9].

### **Mortalidad cardiovascular en el paciente con DM1**

Los pacientes con DM1 tienen mayores tasas de mortalidad en comparación con la población general en todas las edades, tal como se observó en el *British Diabetic Association Cohort Study* [10]. Las complicaciones microvasculares, específicamente la presencia de nefropatía diabética, constituían el principal factor de riesgo de morbi-mortalidad en estos pacientes [11]; sin embargo, actualmente existe un incremento en el desarrollo de complicaciones macrovasculares. Un ejemplo de esta situación fue observado en el estudio *Finnish Diabetic Nephropathy (FinnDiane)* iniciado en Finlandia en 1997, en donde se estudiaron 4197 pacientes después de un promedio de seguimiento de 6.5 años, encontrándose 224 casos de enfermedad coronaria, 124 casos de infarto del miocardio, 100 casos de evento vascular cerebral (EVC) y 91 casos de enfermedad vascular periférica. Soedamah-Muthu y cols. en un estudio incluyó 7000 pacientes con DM1, observó un riesgo relativo para eventos cardiovasculares de 3.6 para hombres y 7.7 para mujeres, con un riesgo del 5% de presentar eventos fatales después de los 50 años [12].

Este incremento en la morbi-mortalidad cardiovascular parece estar asociado con la exposición continua a la hiperglucemia con la que se enfrenta el paciente con DM1 y con la mayor incidencia de otros factores de riesgo cardiovascular, por ejemplo en un estudio que incluyó 27 mil pacientes alemanes con DM1, se observó que 8% tenía hipertensión arterial sistémica (HAS) y 29% dislipidemias [13]. Por su parte, Chillarón y cols. en un estudio con 91 pacientes (53 hombres y 38 mujeres) con edad promedio de 39.7 años y hemoglobina glucosilada (HbA1c) promedio de 7.2 %, encontró que 93% de la población tenía hipoalfalipoproteinemia, 20% hipertrigliceridemia, 72% tenía HAS y 58% obesidad abdominal [11]. Respecto a este último punto, una cohorte de 589 pacientes con DM1 del estudio *EDC Pittsburgh*, demostró un cambio en el índice de masa corporal (IMC) en un periodo de 20 años. En dicho estudio se observó un incremento hasta en siete veces en la prevalencia de obesidad ( $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ ) y la prevalencia de sobrepeso ( $IMC 25-30 \text{ kg/m}^2$ ) se incrementó de 26 a 42% [14]. Estas patologías integran parte del síndrome metabólico (SM).

### **Síndrome metabólico y DM1**

El SM, también conocido como Síndrome X fue descrito por primera vez por Reaven en 1988 [15]. Desde entonces han surgido diversas definiciones por grupos como la Organización Mundial de la Salud (OMS) [16], el European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR) [17], el National Cholesterol Education Program (NCEP) [18], la American Association of Clinical Endocrinology (AAACE) [19], la American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI) [20] y la International Diabetes Federation (IDF) [21]. Una de las más usadas en la actualidad es la llamada “definición consenso” que combina los criterios de la AHA/NHLBI: triglicéridos (TAG)  $\geq$  150 mg/dl, colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-c)  $<$ 40 mg/dl en hombres y  $<$ 50 mg/dl en mujeres, presión arterial  $>$  130/85 mmHg y glucosa en ayuno  $\geq$  100 mg/dl, con el ajuste en el parámetro de perímetro de la cintura propuesto por la IDF, de acuerdo al promedio en los estudios poblacionales de cada país. Debido a que esta clasificación es la única que ajusta el perímetro de cintura a cada población, es la más adecuada para el diagnóstico de SM [22].

Desde 1982, DeFronzo menciona que “*los pacientes con DM1 no están exentos de desarrollar resistencia a la insulina*” [23,24] y ante la continua observación de características clínicas y metabólicas compatibles con SM en pacientes con DM1, Teupe y Bergis acuñan el término “doble diabetes” para referirse a pacientes con DM1 y patologías asociadas a la DM2 [25]. Más tarde, se observó que algunos factores de riesgo asociados al desarrollo de doble diabetes son: los antecedentes heredofamiliares de DM2, el aumento del índice de masa corporal (IMC), la distribución central de la grasa corporal, el mayor requerimiento de insulina basal, un patrón de dislipidemia de hipoalfalipoproteinemia e hipertrigliceridemia, una edad mayor, el tiempo de diagnóstico y el tabaquismo [26-29].

Algunos estudios han establecido la prevalencia de SM en pacientes con DM1 utilizando diferentes criterios en distintos tipos de población. Thorn y cols. En el estudio *FinnDiane* al utilizar los criterios de la NCEP: Adult Treatment Panel III (NCEP: ATPIII) encontraron que la prevalencia fue de 38% en hombres y 40% en mujeres [30]. Por otra parte, Pambianco y cols. En el estudio *Pittsburg Epidemiology of Diabetes Complications* observaron una prevalencia del 21% utilizando los criterios de la OMS, del 12% utilizando los criterios de NCEP: ATPIII y del 8% utilizando los criterios de la IDF [31]. Recientemente Chillaron y cols.

encontraron una prevalencia de hasta 31.9% utilizando los criterios de la NCEP: ATP III [11].

Si bien se conoce poco entre la asociación del SM y la DM1, diversos autores han intentado establecer un pronóstico cardiovascular en este tipo de diabetes. Pambianco y cols. Demostraron que la presencia del SM incrementó el riesgo de nefropatía, arteriopatía y enfermedad coronaria en pacientes con DM1 [31]. En el estudio *EURODIAB* se encontró un aumento en la incidencia de enfermedad cardíaca en pacientes con DM1 entre 15 a 60 años de edad, utilizando como factores pronósticos la hipertrigliceridemia, la hipoalfalipoproteinemia y la hipertensión arterial sistémica [32]. Los resultados del *Metascreen* en población italiana reportaron un 54.2% de prevalencia de complicaciones cardiovasculares en pacientes con DM1 y SM definido con los criterios de la AHA/NHLBI y 64.4% usando los criterios de la IDF [33]. Finalmente, Chillaron y cols. En un estudio que reclutó 291 pacientes con DM1, con edad media de 38 años y tiempo de evolución de 15.3 años, encontró que la presencia de SM definida por los criterios de NCEP: ATP III, se relaciona significativamente con el desarrollo de complicaciones macroangiopáticas (50% de SM en pacientes con macroangiopatía vs 24.9% en pacientes sin macroangiopatía,  $p = 0.011$ ).

### **El papel de la inflamación en el desarrollo de SM**

Aún no se conoce con exactitud el mecanismo mediante el cual la doble diabetes aumenta el riesgo de eventos cardiovasculares. Algunas teorías proponen la participación de citocinas inflamatorias, debido al importante papel que juegan en la patogénesis de aterotrombosis en pacientes con y sin DM2. El estudio *Hoorn* en 1999, fue el primero en mostrar que las concentraciones elevadas del factor de von Willebrand (vWF), sVCAM-1 (molécula de adhesión de las células vasculares 1) y la proteína C reactiva (CRP), predecían la mortalidad en un periodo de 5 a 7 años en pacientes con DM2 [34]. En el seguimiento de esta población a los 11.7 años, se observó una asociación entre las concentraciones de CRP, ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular tipo 1), vWF y sVCAM-1 con el incremento en la mortalidad cardiovascular de hasta 43% [35]. Por otra parte, también se observó que los pacientes con DM2 tenían una relación inversamente proporcional con las cifras de adiponectina [36].

También en los pacientes con DM1 se ha observado participación del estado inflamatorio en el desarrollo de complicaciones macrovasculares. Schram y cols., determinaron las concentraciones de CRP, IL-6 y TNF- $\alpha$  en 543 pacientes con DM1 seguidos por el *EURODIAB Prospective Complications Study*

(seguimiento del estudio *EURODIAB IDDM Complications Study* que se llevó a cabo de 1988 a 1991 en 3250 pacientes con DM1 captados de 31 centros de atención europeos). En este estudio, encontraron diferencias significativas en la presencia de HAS (57% vs 13%,  $p < 0.001$ ), cifras de c-HDL ( $1.60 \pm 0.43$  vs  $1.69 \pm 0.45$  mmol/L,  $p = 0.02$ ), cifras de c-LDL ( $3.28 \pm 1.10$  vs  $2.86 \pm 0.93$  mmol/L,  $p < 0.001$ ), cifras de TAG ( $1.14$  vs  $0.84$  mmol/L,  $p < 0.001$ ), concentraciones de CRP ( $1.32$  vs  $0.69$  mg/L), IL-6 ( $2.14$  vs  $1.55$  pg/ml) y TNF- $\alpha$  ( $3.17$  vs  $2.23$  pg/ml) entre los pacientes con y sin complicaciones vasculares (definidas como historia de infarto del miocardio, angina, colocación de bypass coronario, EVC y/o cambios electrocardiográficos). Además, encontraron que las cifras de estos marcadores pro-inflamatorios (en especial las cifras de TNF- $\alpha$ ) estaban directamente asociadas con albuminuria, retinopatía y enfermedad cardiovascular e inversamente relacionadas con la tasa de filtración glomerular [37].

En un estudio realizado por Snell-Bergeon y *cols.* que incluyó 553 pacientes con DM1 y 215 pacientes no diabéticos que participaron en el *SEARCH Case-Control Study* (un estudio desarrollado en Colorado y Carolina del Sur, EUA en donde se captaron pacientes de 10 a 22 años de diferentes grupos étnicos), se encontraron concentraciones mayores de IL-6 ( $8.8$  vs  $3.3$  pg/ml,  $p < 0.001$ ) y fibrinógeno ( $355$  vs  $286$  mg/dl,  $p < 0.001$ ) y menores de leptina ( $5.4$  vs  $7.8$  ng/dl,  $p < 0.001$ ) en los pacientes con DM1 en comparación con el grupo control independientemente del sexo, raza, presencia de hiperglucemia y obesidad; sin embargo no se encontraron diferencias significativas en las cifras de CRP entre ambas poblaciones, ni en las concentraciones de leptina en la población hispana. Por otra parte, encontraron que en los pacientes con DM1 las concentraciones de IL-6 estaban inversamente relacionadas con la concentración de c-HDL ( $-0.11$ ,  $p < 0.05$ ), mientras que las concentraciones de hsCRP y fibrinógeno estaban relacionados de forma proporcional con la concentración de colesterol ( $0.13$  y  $0.25$ ,  $p < 0.001$ ), c-LDL ( $0.12$  y  $0.23$ ,  $p < 0.05$  y  $< 0.001$ , respectivamente) y apoB ( $0.17$  y  $0.31$ ,  $p < 0.001$ ) [38]. Estos resultados parecen apoyar la teoría de que el estado inflamatorio interactúa con otros factores de riesgo cardiovascular [39].

Por otra parte, un estudio publicado por Ong y *cols.*, sugiere que la hipoadiponectinemia juega un papel importante como vínculo entre las concentraciones de CRP y el deterioro del metabolismo de glucosa [40]. Hivert y *cols.* encontró una relación inversa entre las concentraciones de adiponectina y el desarrollo de resistencia a la insulina determinada por HOMA-IR, así como un incremento en las concentraciones de resistina y TNF- $\alpha$  en los pacientes con

resistencia a la insulina y/o SM [41]. Otros estudios también han asociado la resistencia a la insulina con concentraciones elevadas de IL-6, TNF- $\alpha$  y CRP [42]. Síndrome metabólico, resistencia a la insulina y diabetes tipo 1: perspectiva mexicana.

El Hospital de Especialidades de Centro Médico Siglo XXI, cuenta con la clínica de Diabetes Mellitus tipo 1 desde el año 2008, con una población total de aproximadamente 250 pacientes. Recientemente analizamos la información de 140 pacientes que cuentan con datos bioquímicos y antropométricos completos, los cuales se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Características basales de los pacientes (n= 140)

Parámetro	
Edad, años (mediana, RI)	28 (22-37)
Sexo femenino, %	70
Tiempo de evolución, años (mediana, RI)	17 (11-25)
WC, cm (media $\pm$ DE)	84.7 $\pm$ 10.8
Hombres	88.6 $\pm$ 9.76
Mujeres	82.9 $\pm$ 10.9
Cadera, cm (media $\pm$ DE)	95.5 $\pm$ 9.8
Hombres	96.6 $\pm$ 9.6
Mujeres	95 $\pm$ 9.9
IMC, kg/m <sup>2</sup> (media $\pm$ DE)	24.7 $\pm$ 3.68
Hombres	24.6 $\pm$ 3.74
Mujeres	23.5 $\pm$ 3.09
ICC (media $\pm$ DE)	0.89 $\pm$ 0.07
Hombres	0.92 $\pm$ 0.06
Mujeres	0.88 $\pm$ 0.06
WHTR (mediana, RI)	0.51 (0.47-0.55)
eGDR mg/kg/min (mediana, RI)	7.86 (6.3-9.01)
Hombres	7.2 (5.7-8.21)
Mujeres	8.3 (6.6-9.14)
TAS, mmHg (mediana, RI)	110 (100-120)
TAD, mmHg (media $\pm$ DE)	67.8 $\pm$ 8.39
Dosis de insulina, Unidades (mediana, RI)	52.2 (42-63)
Depuración de creatinina, ml/min (mediana, RI)	77.7 (34.3-98)
Glucosa, mg/dl (mediana, RI)	144 (92.2-233.5)
HbA1c, % (mediana, RI)	8.3 (8-10)
Colesterol, mg/dl (mediana, RI)	182 (157-214)
Triglicéridos, mg/dl (mediana, RI)	110.5 (77.2-163.5)
c-HDL, mg/dl (mediana, RI)	53 (44-65)
Hombres	46 (39-54)
Mujeres	57 (46-68)
c-LDL, mg/dl (mediana, RI)	106 (86-124)
IL-8, pg/ml (mediana, RI)	18.2 (8.68-41.22)
IL-6, pg/ml (mediana, RI)	1.5 (1.5-3.2)
IL-10, pg/ml (mediana, RI)	2.3 (2.3-3)
TNF, pg/ml (mediana, RI)	2.7 (2.7-4.8)
Adiponectina, ng/ml (mediana, RI)	9.37 (5.68-15.47)
Resistina, pg/ml (mediana, RI)	1180.27 (775.75-1896.78)

En esta población, se definió SM utilizando los “criterios consenso”[22], cuando se presentaran tres de cuatro componentes: hipertrigliceridemia (triglicéridos  $\geq 150$  mg/dl o uso de medicamentos para su control), hipoalfalipoproteinemia (c-HDL  $\leq 50$  mg/dl en mujeres o  $\leq 40$  mg/dl en hombres), hipertensión arterial (tensión arterial  $\geq 130/85$  mmHg o uso de medicamentos antihipertensivos) y/o obesidad central (WC  $\geq 90$  cm en hombres y  $\geq 80$  cm en mujeres). Debido a que se trata de pacientes con DM1, se obvió el criterio de cifras de glucemia, mayores o iguales a 100 mg/dl. De acuerdo a esta clasificación el 44% de la población (n= 61) tiene SM. La prevalencia de los componentes del SM se detalla en la figura 1.

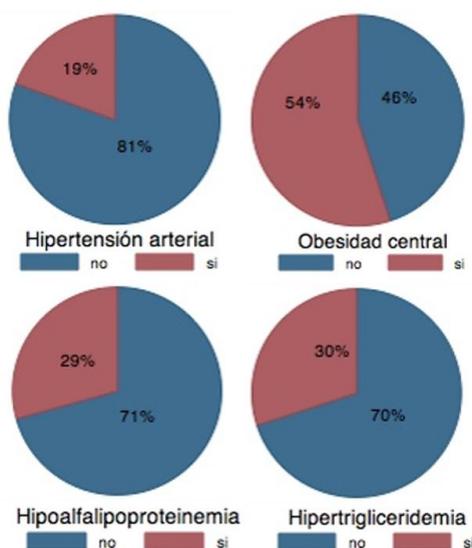


Figura 1. Componentes del SM en pacientes con DM1

Tal como se muestra en la figura 1, el componente de SM más prevalente en nuestra población fue la obesidad central, encontrándose en 71 pacientes (54%), de los cuales 53 eran mujeres (prevalencia de 58%) y 18 eran hombres (prevalencia de 43%). Además, se utilizaron los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [43] para definir obesidad y sobrepeso. De acuerdo a esta clasificación solo 58% de los pacientes (n= 78) tenían IMC normal ( $\leq 25$  kg/m<sup>2</sup>), mientras que 33% de los pacientes (n= 46) tenían sobrepeso (IMC  $\geq 25$  a 29.99 kg/m<sup>2</sup>) y 8% (n= 11) tenían obesidad grado I (IMC  $\geq 30$  a 34.99 kg/m<sup>2</sup>). No se identificaron pacientes con otros grados de obesidad.

Posteriormente se analizaron y compararon los parámetros bioquímicos y clínicos en los pacientes con y sin SM. Se encontró que los pacientes con SM tienen edad y tiempo de diagnóstico mayor. Por otra parte, los parámetros antropométricos asociados al desarrollo de SM como IMC, WC, perímetro de cadera, ICC y WHtR fueron significativamente mayores en la población con SM en comparación con la población sin SM; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar el perímetro de cadera en la población masculina (Tabla II). Además, se observó mayor concentración de colesterol total, triglicéridos, c-LDL y menor concentración de c-HDL en los pacientes con SM (esta diferencia no fue significativa en la población masculina). No se encontraron diferencias significativas en la depuración de creatinina, en las concentraciones de HbA1c ni en las dosis de insulina utilizadas.

Tabla II. Parámetros bioquímicos y clínicos de los pacientes con y sin síndrome metabólico

Parámetro	Pacientes con SM (n=61)	Pacientes sin SM (n=79)	p*
Edad, años (mediana, RI)	34 (24-42)	26 (20-32)	0.001
Tiempo de evolución, años (mediana, RI)	19 (12.5-27.5)	16 (10-22)	0.021
WC, cm (media ± DE)	90.3 ± 10	80 ± 9.2	<0.001
Hombres	92.3 ± 11.31	85.9 ± 7.61	0.05
Mujeres	89.5 ± 9.56	77.2 ± 8.65	<0.001
Cadera, cm (media ± DE)	99.2 ± 9.4	80 ± 9.2	<0.001
Hombres			
Mujeres	96 ± 11.4	97.1 ± 8.48	0.78
Hombres	100.3 ± 8.48	90.3 ± 8.76	<0.001
IMC, kg/m <sup>2</sup> (media ± DE)	26.1 ± 3.83	23.5 ± 3.09	<0.001
Hombres			
Mujeres	25.7 ± 4.1	23.8 ± 3.3	0.124
Hombres	26.3 ± 3.7	23.3 ± 3	<0.001
ICC (media ± DE)	0.9 ± 0.06	0.87 ± 0.07	0.001
Hombres	0.95 ± 0.04	0.90 ± 0.06	0.016
Mujeres	0.90 ± 0.07	0.86 ± 0.06	0.009
WHtR (mediana, RI)	0.54 (0.5-0.6)	0.48 (0.45-0.52)	<0.001
TAS, mmHg (mediana, RI)	110 (100-120)	110 (100-120)	NS
TAD, mmHg (media ± DE)	68.7 ± 8.43	67 ± 8.34	NS
Dosis de insulina, Unidades (mediana, RI)	54 (43-72)	52 (42-60)	NS
U/kg peso (mediana, RI)			
Hombres	0.67 (0.54-0.93)	0.83 (0.63-1.04)	
Depuración de creatinina, ml/min (mediana, RI)	77.9 (30.5-97)	76 (46.9-98)	NS
Glucosa, mg/dL (mediana, RI)	150 (88-220)	140 (94-238)	NS
HbA1c, % (mediana, RI)	9 (8-10)	8 (8-10)	NS
Colesterol, mg/dL (mediana, RI)	198 (163-240)	175 (153-206)	0.005
Triglicéridos, mg/dL (mediana, RI)	164 (113-241)	89 (65-119)	<0.001
c-HDL, mg/dL (mediana, RI)	46 (37-59)	57 (47-67)	<0.001
Hombres			
Mujeres	44 (35.7-52.7)	46.5 (42.2-54)	0.23
Hombres	51 (37-63)	61 (53-71)	<0.001
c-LDL, mg/dL (mediana, RI)	112 (94.5-137.5)	103 (80-116)	0.018

\* U de Mann-Whitney para variables no paramétricas o t de Student para variables paramétricas.

Respecto al perfil inflamatorio, en la Tabla III se muestra la concentración de las diferentes citocinas analizadas. Únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de resistina entre los dos grupos de pacientes. Además, se observó una tendencia al incremento en la concentración de IL-8 en los pacientes con SM. No se encontraron diferencias significativas al analizar las concentraciones de citocinas por sexo, terciles de HbA1c (<7%, 7-8% o >8%) o por grados de obesidad (IMC <25, 25-29 y >29 kg/m<sup>2</sup>) [datos no mostrados].

Tabla III. Perfil inmunológico de los pacientes con y sin SM

Parámetro	Pacientes con SM (n=61)	Pacientes sin SM (n=79)	p*
IL-8, pg/ml (mediana, RI)	24.6 (12.65-46.5)	13.4 (7.0-34.4)	0.064
IL-6, pg/ml (mediana, RI)	1.5 (1.5-4.7)	1.5	NS
IL-10, pg/ml (mediana, RI)	2.3 (2.3-4.4)	2.3	NS
TNF, pg/ml (mediana, RI)	2.7 (2.7-7.8)	2.7	NS
Adiponectina, pg/ml (mediana, RI)	8.85 (5.36-14.85)	9.41 (6.57-15.56)	NS
Resistina, pg/ml (mediana, RI)	1627.4 (838.8- 2233.8)	1054.96 (631.8- 1459.2)	0.010

\* U de Mann-Whitney

En la Tabla IV se observan los coeficientes de correlación entre las citocinas. Se observa que la resistina se asocia positivamente con IL-8, IL-6, IL-10 y TNF y que su correlación con IL-6 y TNF es mayor en los pacientes con SM, mientras que su correlación con IL-10 se pierde al analizar por subgrupos. Además, se observa que la correlación de IL-10 con IL-6 y de TNF con IL-10 e IL-6 es mayor en los pacientes sin SM. No se encontró correlación entre las citocinas y

otros parámetros bioquímicos ni entre adiponectina y resistina (datos no mostrados); sin embargo se encontró una correlación negativa entre la eGDR y las concentraciones de adiponectina ( $\rho = -0.420$ ,  $p = 0.001$ ) y eGDR y las concentraciones de resistina ( $\rho = -0.286$ ,  $p = 0.030$ ).

Tabla 4. Coeficientes de correlación de las citocinas en la población general, con y sin SM\*.

	Población general				Pacientes con SM				Pacientes sin SM			
	IL-8	IL-6	IL-10	TNF	IL-8	IL-6	IL-10	TNF	IL-8	IL-6	IL-10	TNF
IL-6	0.45 8 <sup>a</sup>				0.44 7 <sup>b</sup>				0.43 5 <sup>b</sup>			
IL-10	0.43 6 <sup>a</sup>	0.76 1 <sup>a</sup>			0.24 1	0.67 6 <sup>a</sup>			0.52 3 <sup>b</sup>	0.85 5 <sup>a</sup>		
TNF	0.55 4 <sup>a</sup>	0.57 9 <sup>a</sup>	0.57 0 <sup>a</sup>		0.44 5 <sup>c</sup>	0.53 1 <sup>a</sup>	0.49 2 <sup>b</sup>		0.55 1 <sup>a</sup>	0.60 3 <sup>a</sup>	0.63 8 <sup>a</sup>	
AdipoQ	0.14 6	0.14 2	0.10 3	0.12 2	0.24 3	0.08 0	0.04 7	0.25 4	0.12 9	0.23 2	0.17 1	0.05 7
Resistina	0.39 6 <sup>b</sup>	0.39 8 <sup>b</sup>	0.31 4 <sup>b</sup>	0.53 3 <sup>a</sup>	0.36 3 <sup>d</sup>	0.53 2 <sup>b</sup>	0.34 8	0.58 2 <sup>b</sup>	0.37 8 <sup>c</sup>	0.25 4	0.25 4	0.45 7 <sup>b</sup>

\* utilizando Prueba de Spearman: <sup>a</sup>  $p < 0.001$ , <sup>b</sup>  $p = 0.001$ , <sup>c</sup>  $p = 0.01$ , <sup>d</sup>  $p = 0.05$

## Discusión

México es uno de los países con mayores prevalencias de obesidad [44] y síndrome metabólico [45], situación que también afecta a los pacientes con DM1. La presencia de los componentes del SM (hipertensión arterial, dislipidemia aterogénica y obesidad central) en los pacientes con DM1 es conocida desde hace dos décadas con el nombre de: “doble diabetes” [25]. Algunos estudios han mostrado que la presencia de esta asociación incrementa el riesgo de nefropatía, arteriopatía y enfermedad coronaria [27,31,32]. Sin embargo, este término continúa generando controversia debido a cuatro aspectos principales: 1) no se conoce con exactitud su prevalencia en la población mexicana, 2) se desconoce su efecto cardiovascular a largo plazo, 3) no existen herramientas útiles para su detección y 4) su mecanismo fisiopatológico no ha sido dilucidado. De hecho, se

conoce que en enfermedades como DM2 o SM el ambiente pro-inflamatorio generado incrementa *per se* el riesgo cardiovascular, pero la interacción de estos factores en el paciente con DM1 aún no ha sido estudiada.

La prevalencia de SM en los pacientes con DM1 depende de la población estudiada y de los criterios diagnósticos utilizados, de tal forma que se ha reportado en la literatura universal entre el 8 al 40%. En el análisis inicial de los datos recabados en los primeros 130 pacientes de la Clínica de DM1 del Hospital de Especialidades del CMN SXXI, encontramos que 37.5% de los pacientes tuvieron SM utilizando 3 de 5 criterios diagnósticos de la AHA/NHLBI (además de glucosa elevada, condición común a nuestros pacientes) y 14.5% al utilizar 4 de 5 criterios. Esta prevalencia disminuyó hasta 25% al utilizar 3 de los criterios de la NCEP:ATPIII y a 11.5% utilizando 4 criterios [46]. Si bien estas clasificaciones son ampliamente utilizadas a nivel internacional, al adaptar los puntos de corte del perímetro de cintura de la AHA/NHLBI utilizando los propuestos por la IDF (clasificación consenso) [22], se determina de forma más precisa la prevalencia de SM en la población mexicana. Así, en la muestra final de 141 pacientes con DM1 recabados hasta el momento, la prevalencia de SM utilizando los criterios consenso se incrementó hasta el 44%, siendo la prevalencia más alta reportada hasta el momento [11,30,33].

El componente de SM más prevalente en la población estudiada fue la obesidad abdominal, siendo mayor en la población femenina. Esto concuerda con lo referido por Chillaron y cols. [11] (58.6%) y difiere de lo reportado por Baez y cols. [47] (30%) y Clausen y cols. [48] (43%) y parece estar relacionado con lo que algunos investigadores llaman la “era post-DCCT” [49]. Este término se refiere a que de acuerdo a los resultados del DCCT, los pacientes con DM1 con tratamiento intensivo, tienen una menor incidencia de complicaciones microvasculares; sin embargo, esto conduce a una mayor incidencia de hipoglucemias y al incremento de peso relacionado con las mayores dosis de insulina utilizadas. De hecho, en la era pre-DCCT el IMC de los pacientes con DM1 era inclusive menor al de la población general [50] y en un periodo de 20 años, la prevalencia de obesidad se incrementó hasta siete veces y la prevalencia de sobrepeso tuvo un incremento del 47% [14].

Por otra parte, también encontramos una alta prevalencia de hipoalfalipoproteinemia y de hipertrigliceridemia, lo cual concuerda con lo reportado por Baez y cols. (25%) [47], y difiere con lo reportado por

Chillaron y cols. [11] (16.9% de hipoalfalipoproteinemia y 6% de hipertrigliceridemia) y por Clausen y cols. [48] (6% de hipertrigliceridemia). Este patrón de dislipidemia aterogénica es altamente prevalente en nuestro país, tal como se reportó en los datos recabados en la *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006* (ENSANUT 2006) [51], donde el 17% de la población general tenía hipertrigliceridemia y hasta 47% hipoalfalipoproteinemia y puede ser parcialmente explicado por algunos componentes genéticos característicos de nuestra población, como la variante R230C del transportador *ATP-binding cassette A1* asociada a niveles bajos de c-HDL [52] o bien algunos locus como *NPC1*, *APOA5*, *GCKR* y *LPL* asociados a hipertrigliceridemia [53]. Sin embargo, se requieren estudios que analicen si estos locus también están presentes en los pacientes con DM1 o se trata de la influencia de otras variantes genéticas específicas en esta población.

Al comparar las características bioquímicas y clínicas de los pacientes con y sin SM, encontramos que los que ya presentan SM tienen mayor edad y tiempo de diagnóstico. Esto ha sido reportado previamente por otros investigadores [11,25] y pudiera explicar que en una valoración inicial la prevalencia de SM en nuestra población era menor. Sin embargo, no existen estudios prospectivos que hayan evaluado la influencia de estos factores en el desarrollo de SM. Esto puede estar relacionado en primer lugar, con la alta mortalidad de los pacientes con DM1 que condiciona que la mayoría de los estudios reporten pacientes menores de 40 años y en segundo lugar, con la falta de seguimiento desde edades tempranas, de los factores de riesgo cardiovascular en estos pacientes.

Respecto al patrón inmunológico, no encontramos diferencias significativas en las citocinas inflamatorias IL-6, TNF ni IL-10. El análisis mediante citometría de flujo, nos permitió cuantificar simultáneamente otras citocinas como IL-8 e IL-12; sin embargo, tampoco fueron significativas. Esto difiere a lo referido en el estudio EURODIAB en donde se encontraron concentraciones más elevadas de IL-6 y TNF- $\alpha$  en los pacientes con DM1 y complicaciones microvasculares [32]. En cambio, encontramos que los pacientes con síndrome metabólico tienen concentraciones más altas de resistina. Esto concuerda con lo reportado por Geyikli y cols., [54] donde los pacientes con DM1 tenían concentraciones más elevadas en comparación con los pacientes sin diabetes y contrasta con lo reportado por Fehmann y cols., [55] quienes no encontraron diferencias entre este grupo de pacientes. Este es el primer estudio que explora la concentración de citocinas en pacientes con doble diabetes; además, las concentraciones de resistina encontradas en nuestra población difieren por mucho a las

concentraciones reportadas en otros estudios (Geyikli y cols. refieren concentraciones de resistina en DM1 de 5.26 ng/ml, Fehmann reporta concentraciones de 39.4 ng/ml y nosotros encontramos concentraciones de 1180.19 ng/ml) [54,55] y se correlacionan de forma negativa con la eGDR. Se requieren más estudios que confirmen esta concentración en la población mexicana y que valoren algún factor genético asociado a estas altas concentraciones y que pudieran relacionarse con el desarrollo de resistencia a la insulina.

La resistina es un péptido sintetizado y secretado por el tejido adiposo relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina y DM2 [56]. Si bien, el mecanismo fisiopatológico por el cual la resistina induce resistencia a la insulina no se ha dilucidado, parece que tiene un papel inhibitor sobre las vías que involucran a CD36, la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP1), la acetil coA carboxilasa (ACC) y la cinasa dependiente de AMP (AMPk), de acuerdo a algunos modelos murinos [56]. Además, parece tener un efecto regulador sobre la expresión génica de ciertas citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 a través de la vía de NF-KB [57,58], por lo cual recientemente se ha descrito su papel en enfermedades como artritis reumatoide y aterosclerosis [56]. De hecho, encontramos que esta adipocina se correlaciona con la IL-6 y TNF, especialmente en los pacientes con SM.

En este estudio no encontramos diferencias en la concentración de adiponectina; sin embargo, la mediana de concentración en nuestros pacientes está muy por debajo de lo reportado en otros estudios [54]. Si bien se ha asociado a la hipoadiponectinemia en el desarrollo de SM en los pacientes con DM2 [59], el paciente con DM1 parece tener concentraciones más elevadas [60]. Esto parece relacionarse con un mecanismo compensatorio asociado al incremento en el estrés oxidativo en estos pacientes [61]. Además, encontramos que existe una correlación negativa entre la concentración de adiponectina y la eGDR, lo cual difiere de lo reportado por Pereira y cols., [62] y Blaslov y cols. [63] Por este motivo, sugerimos que en nuestros pacientes, la adiponectina parece tener un papel más bien proinflamatorio. Esto también fue observado con la IL-10, que tuvo una correlación positiva con otras citocinas proinflamatorias como IL-6 o TNF. Este efecto paradójico (citocinas usualmente antiinflamatorias que en algunos casos se comportan como proinflamatorias) también se ha encontrado en otras patologías como el cáncer de tiroides [64], la enfermedad vascular cerebral [65], el Lupus Eritematoso Sistémico, el síndrome de Sjögren y otras patologías autoinmunes

[66] y parece relacionarse con el microambiente inflamatorio, de tal forma que el comportamiento pro o antiinflamatorio de algunas citocinas, dependerá de la enfermedad estudiada y del tipo de respuesta inmunológica involucrada.

Uno de los objetivos de este estudio era identificar si la presencia de SM incrementa el riesgo cardiovascular en los pacientes con DM1 por medio del incremento en la concentración de algunas citocinas inflamatorias. Si bien estos resultados iniciales no encontraron diferencias en la concentración de algunas citocinas séricas, no podemos descartar por completo esta teoría. De hecho, este estudio es el primer en identificar que la concentración de resistina está incrementada en los pacientes con doble diabetes.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. En primer lugar, se trata de un estudio transversal que no nos permite identificar el efecto de algunas variables como el tiempo de evolución sobre el desarrollo de SM. En segundo lugar, consideramos que la concentración real de las citocinas se encuentra muy por debajo de lo esperado, debido al efecto dilucional. Una solución a considerar, sería el determinar la expresión de mRNA de algunas de estas citocinas en células mononucleares o en el tejido adiposo de esta población. En tercer lugar, si bien estas citocinas son las más ampliamente estudiadas, aún se requiere profundizar en el conocimiento de otros factores pro y antiinflamatorios como la respuesta de IL-17, las vías relacionadas con TGF- $\alpha$  o la respuesta inflamatoria relacionada con actividad endotelial (E-selectina, VCAM-1 o ICAM-1) en los pacientes con doble diabetes. Finalmente, si bien el poder estadístico alcanzado con nuestros resultados es mayor al 80%, consideramos que obtener una muestra mayor nos permitiría definir con claridad si existe una diferencia entre estas citocinas.

Será importante evaluar en futuras investigaciones la repercusión de los factores cardiovasculares encontrados, considerando que se trata de una población en etapa productiva que genera altos costos de atención, incapacidad y potencialmente mortalidad elevada. Estos estudios permitirán además planificar medidas preventivas (farmacológicas y no farmacológicas) encaminadas a disminuir el desarrollo de SM en los pacientes con DM1.

### **Conclusiones**

\*Existe una elevada prevalencia del SM en la población mexicana con DM1. Esta asociación podría ser la responsable del incremento en la incidencia de complicaciones macrovasculares, que no ha podido ser completamente explicada por el control metabólico o el uso de insulina en estos pacientes.

\*Es evidente que el incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad reportada en la población general en la última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, también afecta a los pacientes con DM1. Así, la obesidad central afecta a más de la mitad en este grupo.

\*La hipertrigliceridemia es el componente del SM más prevalente en los pacientes con doble diabetes. La hipoalfalipoproteinemia también es muy frecuente en esta población.

\*No encontramos diferencias significativas en las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF entre los pacientes con y sin síndrome metabólico. A pesar de que no encontramos diferencias entre estos grupos en la concentración de IL-10 y adiponectina, tal parece que en los pacientes con DM1 tienen un papel proinflamatorio. Esta teoría necesita ser corroborada, verificando la concentración de otras citocinas anti-inflamatorias.

\*En este estudio observamos que los pacientes con DM1 y SM tienen concentraciones más elevadas de resistina. Esta adipocitocina podría contribuir al mecanismo fisiopatológico aún no identificado para el desarrollo de doble diabetes.

\*Se requieren más estudios que permitan aclarar si la inflamación crónica relacionada con el incremento en la prevalencia de obesidad central, el mayor tiempo de exposición a la hiperglucemia o algún factor genético, son responsables del desarrollo de SM en el paciente con DM1.

## Referencias

1. Wherrett, D. K., and Daneman, D. (2009) *Endocrinol Metab Clin North Am* **38**, 777-790
2. Sutherland, D. E., Goetz, F. C., and Najarian, J. S. (1984) *Transplantation* **38**, 625-633
3. Nicholas, D., Odumosu, O., and Langridge, W. H. (2011) *Discov Med* **11**, 293-301
4. Gillespie, K. M. (2006) *CMAJ* **175**, 165-170
5. (1990) *Diabetes Care* **13**, 1062-1068
6. (1989) *Diabetes Care* **12**, 487-493

7. Aude Rueda, O., Libman, I. M., Altamirano Bustamante, N., Robles Valdes, C., and LaPorte, R. E. (1998) *Diabetes Care* **21**, 1372-1373
8. Gomez-Diaz, R. A., Perez-Perez, G., Hernandez-Cuesta, I. T., Rodriguez-Garcia Jdel, C., Guerrero-Lopez, R., Aguilar-Salinas, C. A., and Wachter, N. H. (2012) *Diabetes Care* **35**, e77
9. Verge, C. F., Gianani, R., Kawasaki, E., Yu, L., Pietropaolo, M., Chase, H. P., and Eisenbarth, G. S. (1996) *Journal of autoimmunity* **9**, 379-383
10. Krishnan, S., and Short, K. R. (2009) *J Cardiometab Syndr* **4**, 50-56
11. Chillaron, J. J., Flores-Le-Roux, J. A., Goday, A., Benaiges, D., Carrera, M. J., Puig, J., Cano-Perez, J. F., and Pedro-Botet, J. (2010) *Rev Esp Cardiol* **63**, 423-429
12. Soedamah-Muthu, S. S., Fuller, J. H., Mulnier, H. E., Raleigh, V. S., Lawrenson, R. A., and Colhoun, H. M. (2006) *Diabetes Care* **29**, 798-804
13. Schwab, K. O., Doerfer, J., Hecker, W., Grulich-Henn, J., Wiemann, D., Kordonouri, O., Beyer, P., and Holl, R. W. (2006) *Diabetes Care* **29**, 218-225
14. Conway, B., Miller, R. G., Costacou, T., Fried, L., Kelsey, S., Evans, R. W., and Orchard, T. J. (2010) *Diabet Med* **27**, 398-404
15. Reaven, G. M. (1988) *Diabetes* **37**, 1595-1607
16. Alberti, K. G., and Zimmet, P. Z. (1998) *Diabet Med* **15**, 539-553
17. Balkau, B., and Charles, M. A. (1999) *Diabet Med* **16**, 442-443
18. (2001) *JAMA* **285**, 2486-2497
19. Einhorn, D., Reaven, G. M., Cobin, R. H., Ford, E., Ganda, O. P., Handelsman, Y., Hellman, R., Jellinger, P. S., Kendall, D., Krauss, R. M., Neufeld, N. D., Petak, S. M., Rodbard, H. W., Seibel, J. A., Smith, D. A., and Wilson, P. W. (2003) *Endocr Pract* **9**, 237-252
20. Grundy, S. M., Brewer, H. B., Jr., Cleeman, J. I., Smith, S. C., Jr., and Lenfant, C. (2004) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, e13-18
21. Alberti, K. G., Zimmet, P., and Shaw, J. (2005) *Lancet* **366**, 1059-1062
22. Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M., and Smith, S. C., Jr. (2009) *Circulation* **120**, 1640-1645
23. DeFronzo, R. A., Simonson, D., and Ferrannini, E. (1982) *Diabetologia* **23**, 313-319
24. DeFronzo, R. A., Hendler, R., and Simonson, D. (1982) *Diabetes* **31**, 795-801
25. Teupe, B., and Bergis, K. (1991) *Lancet* **337**, 361-362
26. Rodrigues, T. C., Canani, L. H., and Gross, J. L. (2010) *Arq Bras Cardiol* **94**, 134-139

27. Chillaron, J. J., Goday, A., and Pedro-Botet, J. (2008) *Med Clin (Barc)* **130**, 466-470
28. Arai, K., Yokoyama, H., Okuguchi, F., Yamazaki, K., Takagi, H., Hirao, K., and Kobayashi, M. (2008) *Endocr J* **55**, 1025-1032
29. Cleland, S. J. (2012) *Nat Rev Endocrinol*
30. Thorn, L. M., Forsblom, C., Waden, J., Saraheimo, M., Tolonen, N., Hietala, K., and Groop, P. H. (2009) *Diabetes Care* **32**, 950-952
31. Pambianco, G., Costacou, T., and Orchard, T. J. (2007) *Diabetes Care* **30**, 1248-1254
32. Kilpatrick, E. S., Rigby, A. S., and Atkin, S. L. (2007) *Diabetes Care* **30**, 707-712
33. Bonadonna, R. C., Cucinotta, D., Fedele, D., Riccardi, G., and Tiengo, A. (2006) *Diabetes Care* **29**, 2701-2707
34. Jager, A., van Hinsbergh, V. W., Kostense, P. J., Emeis, J. J., Yudkin, J. S., Nijpels, G., Dekker, J. M., Heine, R. J., Bouter, L. M., and Stehouwer, C. D. (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 3071-3078
35. Jager, A., van Hinsbergh, V. W., Kostense, P. J., Emeis, J. J., Nijpels, G., Dekker, J. M., Heine, R. J., Bouter, L. M., and Stehouwer, C. D. (2000) *Diabetes* **49**, 485-491
36. Schulze, M. B., Shai, I., Rimm, E. B., Li, T., Rifai, N., and Hu, F. B. (2005) *Diabetes* **54**, 534-539
37. Schram, M. T., Chaturvedi, N., Schalkwijk, C. G., Fuller, J. H., and Stehouwer, C. D. (2005) *Diabetologia* **48**, 370-378
38. Snell-Bergeon, J. K., West, N. A., Mayer-Davis, E. J., Liese, A. D., Marcovina, S. M., D'Agostino, R. B., Jr., Hamman, R. F., and Dabelea, D. (2010) *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 2868-2876
39. Goldberg, R. B. (2009) *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 3171-3182
40. Ong, K. L., Tso, A. W., Xu, A., Law, L. S., Li, M., Wat, N. M., Rye, K. A., Lam, T. H., Cheung, B. M., and Lam, K. S. (2011) *Diabetologia* **54**, 2552-2560
41. Hivert, M. F., Sullivan, L. M., Fox, C. S., Nathan, D. M., D'Agostino, R. B., Sr., Wilson, P. W., and Meigs, J. B. (2008) *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 3165-3172
42. Natali, A., Toschi, E., Baldeweg, S., Ciociaro, D., Favilla, S., Sacca, L., and Ferrannini, E. (2006) *Diabetes* **55**, 1133-1140
43. (2000) *World Health Organization technical report series* **894**, i-xii, 1-253

44. Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernandez-Barrera, L., Pedroza, A., and Rivera-Dommarco, J. A. (2013) *Salud publica de Mexico* **55 Suppl 2**, S151-160
45. Rojas-Martinez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Jimenez-Corona, A., Gomez-Perez, F. J., Barquera, S., and Lazcano-Ponce, E. (2012) *Salud publica de Mexico* **54**, 7-12
46. Ferreira-Hermosillo A, V.-O. G., González-Virla B, Mercado-Atri M, Molina-Ayala M. (2012) *Gaceta Médica de México* **148**, 137-143
47. Baez, M. S., Novik, A. V., Alegria, G. F., Cardemil, M. F., Riveros, P. R., and Bofill Ch, L. (2009) *Revista medica de Chile* **137**, 888-893
48. Clausen, T. D., Mathiesen, E. R., Hansen, T., Pedersen, O., Jensen, D. M., Lauenborg, J., Schmidt, L., and Damm, P. (2009) *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 2464-2470
49. (1993) *The New England journal of medicine* **329**, 977-986
50. Ogden, C. L., Yanovski, S. Z., Carroll, M. D., and Flegal, K. M. (2007) *Gastroenterology* **132**, 2087-2102
51. Aguilar-Salinas, C. A., Gomez-Perez, F. J., Rull, J., Villalpando, S., Barquera, S., and Rojas, R. (2010) *Salud publica de Mexico* **52 Suppl 1**, S44-53
52. Aguilar-Salinas, C. A., Canizales-Quinteros, S., Rojas-Martinez, R., Mehta, R., Rodriguez-Guillen, R., Ordonez-Sanchez, M. L., Riba, L., and Tusie-Luna, M. T. (2011) *Atherosclerosis* **216**, 146-150
53. Weissglas-Volkov, D., Aguilar-Salinas, C. A., Nikkola, E., Deere, K. A., Cruz-Bautista, I., Arellano-Campos, O., Munoz-Hernandez, L. L., Gomez-Munguia, L., Ordonez-Sanchez, M. L., Reddy, P. M., Lusic, A. J., Matikainen, N., Taskinen, M. R., Riba, L., Cantor, R. M., Sinsheimer, J. S., Tusie-Luna, T., and Pajukanta, P. (2013) *Journal of medical genetics* **50**, 298-308
54. Geyikli, I., Keskin, M., Kor, Y., and Akan, M. (2013) *Journal of clinical research in pediatric endocrinology* **5**, 189-193
55. Fehmann, H. C., and Heyn, J. (2002) *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **34**, 671-673
56. Pang, S. S., and Le, Y. Y. (2006) *Cellular & molecular immunology* **3**, 29-34
57. Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., and Tarkowski, A. (2005) *J Immunol* **174**, 5789-5795
58. Kaser, S., Kaser, A., Sandhofer, A., Ebenbichler, C. F., Tilg, H., and Patsch, J. R. (2003) *Biochemical and biophysical research communications* **309**, 286-290

59. Ryo, M., Nakamura, T., Kihara, S., Kumada, M., Shibasaki, S., Takahashi, M., Nagai, M., Matsuzawa, Y., and Funahashi, T. (2004) *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **68**, 975-981
60. Jorsal, A., Tarnow, L., Frystyk, J., Lajer, M., Flyvbjerg, A., Parving, H. H., Vionnet, N., and Rossing, P. (2008) *Kidney international* **74**, 649-654
61. Prior, S. L., Tang, T. S., Gill, G. V., Bain, S. C., and Stephens, J. W. (2011) *Metabolism: clinical and experimental* **60**, 173-179
62. Pereira, R. I., Snell-Bergeon, J. K., Erickson, C., Schauer, I. E., Bergman, B. C., Rewers, M., and Maahs, D. M. (2012) *J Clin Endocrinol Metab* **97**, E642-647
63. Blaslov, K., Bulum, T., Zibar, K., and Duvnjak, L. (2013) *International journal of endocrinology* **2013**, 535906
64. Provatopoulou, X., Georgiadou, D., Sergentanis, T. N., Kalogera, E., Spyridakis, J., Gounaris, A., and Zografos, G. N. (2014) *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*
65. Tuttolomondo, A., Pecoraro, R., Di Raimondo, D., Di Sciacca, R., Canino, B., Arnao, V., Butta, C., Della Corte, V., Maida, C., Licata, G., and Pinto, A. (2014) *Diabetology & metabolic syndrome* **6**, 28
66. Tian, G., Li, J. L., Wang, D. G., and Zhou, D. (2014) *Cell biochemistry and biophysics*

## Semblanza del M. en C. Aldo Ferreira Hermosillo



### Adscripción actual:

- Médico Adscrito al servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.
- Investigador asociado “B” de la Unidad de Investigación en Endocrinología Experimental, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

- Profesor asociado A del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
- Profesor titular del curso de Endocrinología para alumnos de pregrado, Facultad de Medicina, UNAM.

### Trayectoria académica

Licenciatura Médico Cirujano, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Especialista en Endocrinología (UNAM) certificado por el Consejo Mexicano de Endocrinología.

Maestro en Ciencias Médicas, Facultad de Medicina UNAM/ Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Socio titular de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología.

Early Career Member de la Endocrine Society

### Publicaciones

- Capítulos de libro: 2
- Revistas indexadas internacionales: 7
- Revistas indexadas nacionales: 5
- Revistas no indexadas nacionales: 5

### Líneas de investigación

- Diabetes mellitus tipo 1
- Obesidad
- Síndrome metabólico



Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 187-204, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS TRONCALES

### NEURAL DIFFERENTIATION OF STEM CELLS

Iván Velasco<sup>1</sup>, Itzel Escobedo-Avila<sup>1,2</sup>, Daniel Cortés<sup>1</sup>, Oscar Carballo-Molina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fisiología Celular – Neurociencias, <sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México, D.F.- 04510, México.

### RESUMEN

Las células troncales comparten dos características definitorias: autorrenovación en un estado indiferenciado y la capacidad de diferenciación para producir células especializadas. Las células troncales participan tanto en el desarrollo normal como en la renovación de algunos tejidos en organismos adultos. Las células troncales con capacidad de diferenciación neural se encuentran en el sistema nervioso en desarrollo y en regiones restringidas del cerebro adulto. Estas células troncales y progenitoras neurales se pueden diferenciar a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Se ha descrito que la expresión de genes y la activación de receptores pueden influir de manera importante en el compromiso de diferenciación de células troncales neurales. Por otro lado, diversos estudios han permitido identificar estímulos para comprometer a células troncales pluripotenciales muy primitivas a células neurales y

posteriormente a neuronas. Se han producido neuronas que al ser trasplantadas pueden integrarse al cerebro y mejorar el comportamiento de animales con deficiencias motoras. Recientemente, la descripción de la reprogramación de células somáticas diferenciadas a un estado pluripotencial debida a la expresión de factores de transcripción, ha abierto la posibilidad de tener neuronas histocompatibles con el paciente afectado por condiciones neurológicas crónicas, para el posible tratamiento de la misma persona cuando las condiciones de bioseguridad sean las adecuadas. Además, la reprogramación para producir células pluripotenciales inducidas (iPSC) de pacientes puede generar neuronas útiles para entender mecanismos de patogénesis y buscar compuestos que puedan aliviar la condición de personas enfermas. La expresión de factores transcripcionales específicos de neuronas en fibroblastos ha permitido la conversión directa de fenotipo sin involucrar un estado indiferenciado. Todos estos hallazgos permiten especular que en el futuro la manipulación de células troncales puede convertirse en tratamiento para diversas afecciones del Sistema Nervioso Central.

**Palabras clave:** Células troncales embrionarias; Desarrollo y diferenciación neural; Reprogramación; Células pluripotenciales inducidas; Conversión directa de fenotipo.

### **ABSTRACT**

Stem cells have two defining properties: they can self-renew and produce specialized cells by entering differentiation. These cells contribute to normal development and participate in the regeneration of adult tissues. Stem cells with neural potential can be obtained from the developing nervous system or from restricted regions of the adult brain. Neural stem/progenitor cells can differentiate to neurons, astrocytes or oligodendrocytes. Differentiation of these cells is influenced by expression of transcription factors and stimulation of receptors. On the other hand, several procedures for the induction of the primitive pluripotent stem cells to neural derivatives have been devised, yielding functional neurons. Such neurons have been transplanted in the brain; they integrate and provide functional recovery in animal models of motoric neurological disorders. Recently, reprogramming of differentiated somatic cells to produce induced pluripotent stem cells (iPSC) by the transient expression of transcription factors has open the possibility to produce cells that are not rejected by the immune system so they might recover lost functions in chronic diseases, once biosafety conditions are in place. iPSC from patients can be used to produce neurons and thus provide a

cellular system for a better understanding of pathogenesis and to test large libraries of molecules that might be used in the clinic. The ectopic expression of neuronal-specific transcription factors in fibroblasts resulted in its direct conversion to neurons, without an intermediate undifferentiated state. All these findings suggest that in the future, manipulation of stem cells might result in treatments for diverse diseases of the Central Nervous System.

**Keywords:** embryonic stem cells, neuronal development and differentiation, pluripotent stem cells induced, phenotype direct conversion.

### **Las células troncales: entidades cambiantes**

Las células troncales comparten dos características definitorias: autorrenovación y potencial de diferenciación. En realidad lo que significa esto es que pueden permanecer en un estado primitivo conocido como indiferenciado mediante divisiones celulares y de manera paralela producir células diferenciadas con funciones específicas. Tanto el estado indiferenciado como el inicio y la consolidación de la diferenciación están regulados por la expresión de factores de transcripción. Las células troncales participan tanto en el desarrollo como en la renovación de algunos tejidos en organismos adultos. Su integración en procesos fisiológicos ha despertado un gran interés en la Biomedicina por su posible utilidad en enfermedades en donde se ha perdido una función por enfermedad, accidente o incluso el envejecimiento. Esta posibilidad ha dado lugar también a que algunos médicos ofrezcan tratamientos no suficientemente seguros ni eficaces con cargo a los pacientes, lo cual resulta inaceptable. Las únicas células aptas para una aplicación clínica en la actualidad son las células troncales/progenitoras hematopoyéticas, que se pueden obtener de la médula ósea, sangre periférica movilizada o la sangre del cordón umbilical [1]. Lo pertinente en caso de que una terapia que involucre células troncales quiera establecerse como un tratamiento viable para una condición es realizar ensayos clínicos en donde se incluyan pacientes que no reciben células para conocer la contribución del efecto placebo.

### **El desarrollo produce células troncales con diferentes potenciales de diferenciación**

En mamíferos, después de la fertilización se dan divisiones celulares que forman la blástula, un estadio en donde no se puede apreciar una diferencia morfológica entre las células que la conforman. El blastocisto, que se implantará en el útero, contiene dos tipos de células claramente distintas: las que se encuentran en la superficie, que se convertirán en tejido placentario y las interiores que incluyen las células de la masa celular interna y las del endodermo

extraembrionario. De esta etapa tan temprana ya se pueden aislar células troncales con diferentes capacidades de diferenciación [2]. De la masa celular interna se pueden generar células troncales embrionarias, tanto de roedores como de primates incluido el humano [3-5]. A estas células se le denomina pluripotenciales, que significa que pueden diferenciarse, en el ambiente adecuado, a todos los tipos celulares presentes en un organismo adulto. El embrión implantado continúa su desarrollo con la gastrulación, que genera las tres capas germinales, conocidas como endodermo, mesodermo y ectodermo. Las capas germinales darán origen a los órganos y tejidos; en esta fase las células troncales son abundantes y después sólo se preservan claramente en tejidos con una alta capacidad de regeneración como la sangre, la piel, el intestino, el músculo, etc. Es frecuente que las células troncales de los tejidos en desarrollo sean multipotenciales, lo que quiere decir que aunque pueden generar varios tipos de células especializadas, éstas se restringen a las presentes en un tejido.

### **Las células troncales neurales durante el desarrollo y el cerebro adulto**

El cerebro es por mucho, el órgano más complejo presente en el cuerpo humano. Por ello, el conocimiento de los procesos que participan en el origen, la autorrenovación y la diferenciación de las células troncales neurales para formar la compleja organización, así como para adquirir y mantener sus funciones en la etapa adulta ha sido tema de interés y estudio por muchos años. El Sistema Nervioso Central (SNC) se forma en etapas tempranas del desarrollo a partir de una capa embrionaria llamada ectodermo, el cual da origen a la placa neural mediante un engrosamiento en su región dorsal. La neurulación se produce por acción de una importante estructura reguladora llamada notocorda, que envía señales a la placa neural para que se produzca una invaginación a lo largo del eje antero-posterior, dando origen al tubo neural, el cual es el rudimento embrionario del SNC [6,7].

El tubo neural es un neuroepitelio estratificado que está formado por una capa de células con una gran plasticidad denominadas células troncales/progenitoras neurales (CTPN) [8]. Las CTPN se han definido de manera general, como células no diferenciadas que tienen una alta capacidad de autorrenovarse y que a la vez pueden dar origen a la gran variedad de tipos neuronales y gliales especializados que se requieren para formar el SNC embrionario, neonato y adulto. La diferenciación del tubo neural en las diversas regiones que conforman el cerebro se produce simultáneamente a nivel anatómico, tisular y celular. Durante el desarrollo embrionario de mamíferos, las neuronas se generan principalmente en etapas tempranas, mientras que las

células de la glía (astrocitos y oligodendrocitos) se producen en etapas cercanas al nacimiento [9]. Durante mucho tiempo se pensó que la génesis, migración e integración de nuevas neuronas al cerebro eran procesos exclusivos del embrión. Sin embargo, en la década de los sesenta se descubrió que en el organismo adulto también existen procesos de neurogénesis [10], lo cual ha refutado uno de los dogmas fundamentales de las neurociencias que postulaba que toda la diferenciación neuronal ocurría antes del nacimiento (Fig. 1). Actualmente, en el cerebro adulto de mamíferos se reconoce la existencia de dos nichos que contienen CTPN: uno en la zona subventricular (ZSV) y otro en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado en el hipocampo [11,12]. Las CTPN se han aislado de tejido neural embrionario y del cerebro adulto; en ambos casos las poblaciones poseen características similares en cuanto a la expresión de marcadores que permiten identificarlas.

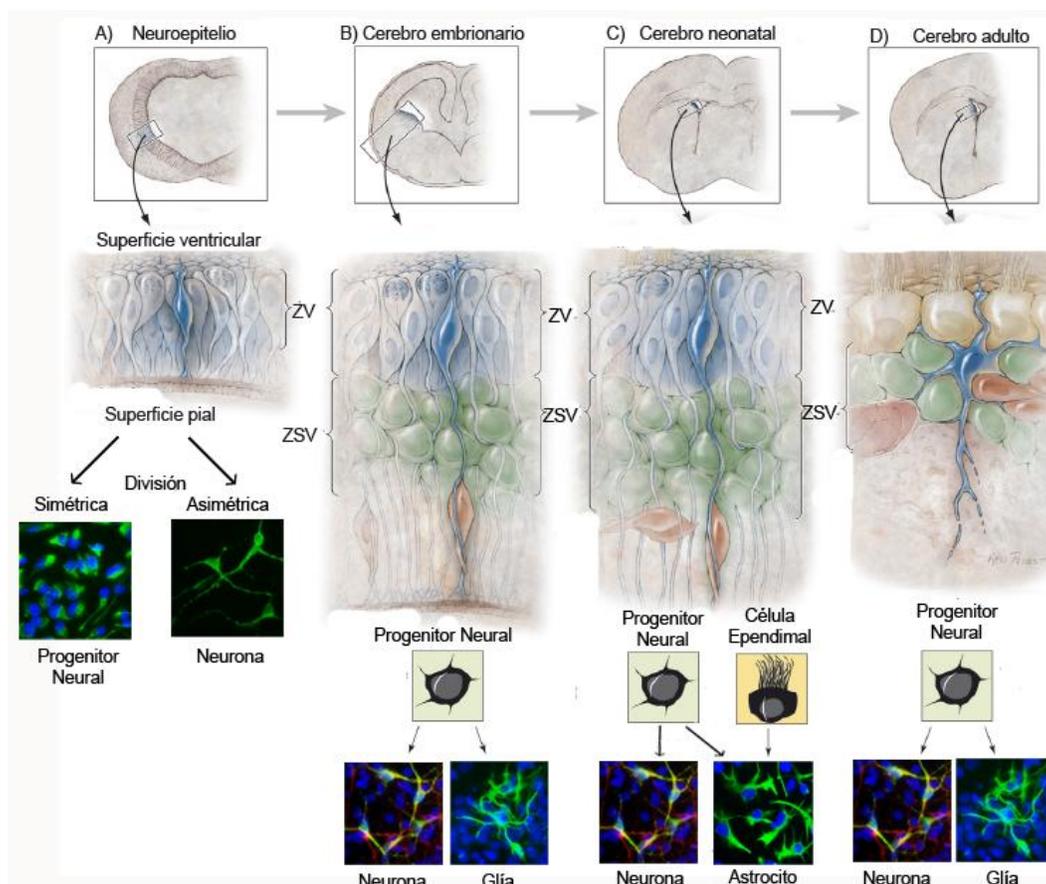


Figura 1. Las células troncales/progenitoras neurales (CTPN) y su progenie durante el desarrollo y en el cerebro adulto. Las CTPN (azul) de la superficie ventricular cambian su forma y producen diferentes progenitores a lo largo del desarrollo. A) En estadios tempranos del desarrollo, el SNC es una estructura tubular formada por células

neuroepiteliales que se dividen simétricamente en la superficie ventricular para dar origen a más CTPN o de manera asimétrica dando origen a neuronas jóvenes. B) Posteriormente, las células neuroepiteliales se diferencian en células de la glía radial que expresa GFAP y que al dividirse, darán origen a neuronas o células gliales, directa o indirectamente, mediante progenitores intermedios (verde) en la zona subventricular (ver texto). Las proyecciones de la glía radial ayudan a la migración de los neuroblastos (rojo). C) Las células de la glía radial permanecen en el cerebro neonatal, en donde generan glía, interneuronas del bulbo olfatorio y las células ependimales producen astrocitos. D) En el cerebro adulto, los astrocitos neurogénicos mantienen procesos radiales que contactan tanto el ventrículo como la lámina basal. Las CTPN generan oligodendrocitos e interneuronas en el bulbo olfatorio. ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular. Modificado de [27].

En estas dos zonas existen células con actividad mitótica y se piensa que las CTPN son células de tipo astrocítico que expresan la Proteína glial fibrilar acídica (GFAP) y la Nestina, una proteína expresada por células neurales no diferenciadas. Esta población fue caracterizada por el investigador mexicano Arturo Álvarez-Buylla, quien describió diversos intermediarios celulares en la neurogénesis adulta, los cuales describiremos a continuación. En la ZSV existe una subpoblación de células que se divide lentamente, tiene la morfología, ultraestructura y marcadores de astrocitos, pero que funciona como CTPN, a las cuales se les denominó tipo B. Estas células con características astrogiales producen células intermediarias de amplificación transitoria tipo C, que se dividen rápidamente para producir las células de tipo A o neuroblastos. Los neuroblastos migran tangencialmente formando la corriente migratoria rostral, que llega al bulbo olfatorio. Dentro del bulbo, los neuroblastos o neuronas jóvenes maduran en varios subtipos de interneuronas que se integran a los circuitos olfatorios postnatales.

Los mecanismos moleculares que controlan la neurogénesis durante el desarrollo embrionario se han estudiado extensamente, por lo que se tiene conocimiento de algunas de las señales extrínsecas e intrínsecas que regulan la proliferación y diferenciación de CTPN. Asimismo, se ha observado que la neurogénesis adulta recapitula parcialmente el proceso de desarrollo neuronal durante la gestación, por lo que muchos de estos factores también tienen funciones importantes durante la neurogénesis en adulto, pero con importantes diferencias en las respuestas celulares debidas al entorno o nicho del cerebro maduro.

### **La diferenciación neuronal**

El SNC está formado por las neuronas, que se comunican entre sí por sinapsis químicas o eléctricas, por los astrocitos, que son las células más abundantes y cumplen funciones de soporte y finalmente por los oligodendrocitos, que se encargan de cubrir de mielina a los axones de las neuronas para una adecuada conducción de los impulsos eléctricos. En conjunto, estas células conforman la complejidad de los circuitos del SNC adulto. La neurogénesis es el proceso de formar neuronas hasta su estado funcional, a partir de CTPN, lo que incluye la proliferación, migración, la adquisición del fenotipo relativo al neurotransmisor que sintetiza la nueva neurona, así como su integración y supervivencia.

En la corteza cerebral, las células neuroepiteliales inicialmente se dividen en forma simétrica sin diferenciar, de manera que en un tiempo corto su número incrementa exponencialmente. Posteriormente, mediante divisiones asimétricas, cada célula genera una neurona que deja de dividirse para migrar radialmente y otra célula no diferenciada que continúa proliferando en la zona ventricular [13]. Durante el desarrollo embrionario, la neurogénesis es promovida inicialmente por la expresión de factores de transcripción pertenecientes a la familia bHLH (basic Helix-Loop-Helix, por sus siglas en inglés) como son la familia de Neurogenina [14] y Mash, los cuales son necesarios para iniciar el desarrollo de linajes neuronales y promover la generación de progenitores que están comprometidos a diferenciarse, inhibiendo simultáneamente destinos gliales [15]. Al mismo tiempo, por medio de un proceso denominado inhibición lateral, la vía de señalización de Notch regula la expresión de genes proneurales en otras células, bloqueando su diferenciación neuronal [8,9,15,16]. La diferenciación terminal está regulada por la expresión de genes proneurales, que son activadores transcripcionales [17-19] y que definen la identidad molecular de la neurona.

Para poder distinguir entre el estado indiferenciado de las CTPN, se han identificado algunas proteínas características: Nestina, que forma parte de los filamentos intermedios y los factores de transcripción Sox1 y Sox2. El estado indiferenciado de las CTPN es promovido por los factores de crecimiento *Epidermal Growth Factor* y *Fibroblast Growth Factor-2*, que activan receptores específicos que promueven la proliferación y simultáneamente previenen la diferenciación. Cuando las CTPN son mantenidas *in vitro*, pueden cultivarse en suspensión, formando neuroesferas, que constituyen un sistema muy accesible para probar la capacidad de autorrenovación porque al disgregarse se formarán nuevas esferas si había células troncales neurales [20]. Una forma alternativa es

utilizar proteínas de matriz extracelular para permitir la adhesión de las CTPN [21]. Este arreglo permite el análisis de las células diferenciadas. A pesar de que las células troncales aisladas de etapas tempranas tienen tendencia a diferenciar preferencialmente a neuronas y las más tardías son mayoritariamente gliogénicas, se puede modular esta diferenciación de manera independiente de su origen: factores de crecimiento como LIF y CNTF instruyen a la diferenciación glial, mientras que PDGF favorece neurogénesis y T3 la oligodendrogénesis [21]. Hay otras moléculas que promueven la neurogénesis de CTPN de la corteza cerebral como histamina [22-24] y Activina A [25]. Por otra parte, la activación de la vía de Notch en CTPN de la corteza cerebral induce un compromiso de diferenciación astrocítica [26].

El origen de las CTPN adultas está en la zona proliferativa del cerebro en desarrollo: a finales de la etapa fetal, sobre la zona ventricular se forma la capa denominada SVZ. En el desarrollo postnatal, cuando disminuye gradualmente la generación de neuronas hasta llegar a la etapa adulta, desaparece la zona ventricular proliferativa y se mantiene únicamente el nicho de proliferación en la SVZ [27]. Las CTPN de la SVZ residen en la porción anterior y los neuroblastos que ahí se generan migran tangencialmente formando la corriente migratoria rostral para llegar al bulbo olfatorio, donde maduran para generar dos subtipos de interneuronas inhibitorias que se integran a los circuitos olfatorios postnatales: las células granulares y las células periglomerulares [28,29]. El continuo recambio de las interneuronas del bulbo olfatorio está regulado por cambios en el microambiente o por modificaciones significativas en los olores percibidos, por lo que estas células participan integrando la información olfatoria. Por otro lado, las CTPN de la ZSG del giro dentado en el hipocampo proliferan y se diferencian, para luego integrarse a la capa granular donde maduran hasta convertirse en neuronas excitatorias [12]. Las CTPN de la ZSG son un tipo específico de astrocitos denominados radiales [30,31]. Contrario a lo que ocurre con las neuronas generadas en la ZSV, las nuevas neuronas de la ZSG se desplazan en distancias cortas dentro de la capa de células granulares. La función de las nuevas neuronas generadas en la ZSG se desconoce, pero se cree que contribuye a los procesos de aprendizaje y memoria del hipocampo [32].

### **Las neuronas diferenciadas de células troncales funcionan en modelos animales de enfermedades neurológicas**

A pesar de que la neurogénesis ocurre en ciertas zonas del cerebro adulto, todavía no se puede inducir de forma controlada, para producir las neuronas requeridas en el sitio adecuado, en condiciones patológicas. Es por esta razón que las CTPN, o las neuronas que generan, se han trasplantado en el cerebro o la médula espinal. Estas CTPN pueden provenir del SNC o de la inducción neural de células pluripotenciales. Existen varios métodos para realizar la inducción neural de células pluripotenciales: incubación con ácido retinoico, inducción con células estromales e incubación con medios libres de suero con distintos suplementos [33-36]. Sin embargo, la diferenciación para producir neuronas de un fenotipo particular requiere de estimulación adicional con distintos factores de crecimiento [37-39]. Un tipo neuronal que se ha estudiado mucho son las neuronas motoras espinales, que se diferencian tempranamente en la parte ventral de la médula espinal. La información obtenida de los factores solubles que se requieren para su inducción durante el desarrollo permitió diseñar estrategias para que se pudieran diferenciar *in vitro* a partir de células pluripotenciales de roedores y de humanos [38,40]. Una gran ventaja para la identificación de estas neuronas es contar con un gen reportero que permite identificarlas: la Proteína Fluorescente Verde, que se expresa al activarse el promotor del gen *Hb9* [38]. Este gen reportero se ha utilizado para identificar a las motoneuronas antes y después del trasplante en la médula espinal (Fig. 2), tanto de pollos en desarrollo [38] como de ratas adultas [41]. En general hay una gran esperanza que las neuronas motoras diferenciadas de células pluripotenciales funcionen en modelos animales de enfermedades, pero los ejemplos exitosos son pocos (revisado en [42]).

Tal vez el tipo de neuronas que se han logrado diferenciar más consistentemente son las que secretan dopamina. Estas neuronas producidas desde el estado pluripotencial han sido trasplantadas en diversos modelos animales de la enfermedad de Parkinson y han permitido la recuperación de diversos parámetros bioquímicos y conductuales [43-50].

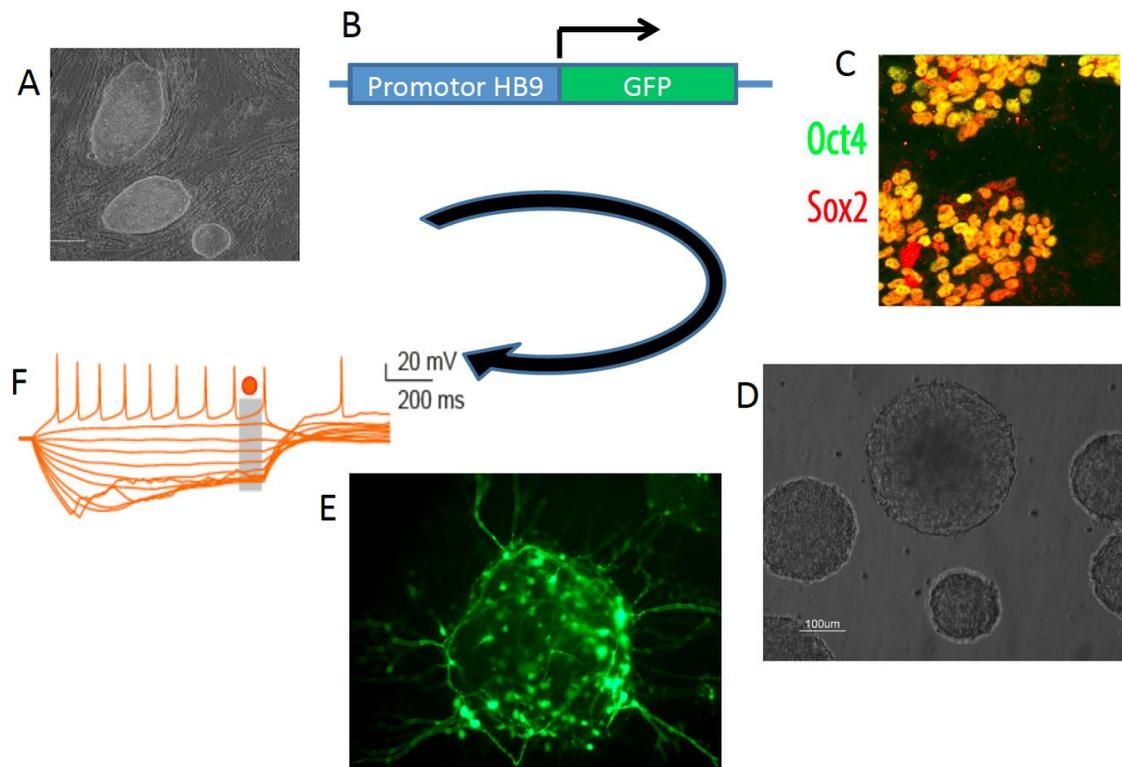


Fig. 2. Diferenciación de células troncales embrionarias de ratón a motoneuronas. A) Fotomicrografía en la que se observan tres colonias de células troncales embrionarias en estado pluripotente creciendo sobre fibroblastos embrionarios de ratón irradiados. B) Esquema de la construcción reportera para identificar a las motoneuronas por la expresión de la Proteína Fluorescente Verde (GFP) dirigida por el promotor HB9. C) Inmunofluorescencia para los factores transcripcionales asociados a pluripotencia Oct4 y Sox2 en células antes de la diferenciación. D) Micrografía donde se muestran cuerpos embrioides que se estimulan con ácido retinoico y Sonic Hedgehog para inducir la diferenciación de células troncales embrionarias a neuronas motoras. E) Estos cuerpos embrioides presentan células que expresan GFP, indicando su diferenciación a motoneuronas. E) Las neuronas que expresan GFP se disociaron y sembraron para realizar registros electrofisiológicos de fijación de corriente en célula completa. Los potenciales de acción que se muestran indican que estas neuronas han madurado para adquirir corrientes iónicas que les permiten presentar disparos repetidos. El punto naranja y la zona sombreada indican la zona que se utiliza para realizar la relación corriente-voltaje, que corresponde al final del estímulo.

**La reprogramación de células somáticas a estado pluripotencial para generar neuronas será útil en identificar mecanismos de patogénesis y nuevos fármacos**

Uno de los objetivos centrales de la Biología del Desarrollo es comprender cómo se comprometen y diferencian los diversos tipos celulares, pero también si

los procesos de diferenciación son irreversibles. Los experimentos de clonación de organismos, incluyendo mamíferos, se realizaron por trasplante del núcleo de una célula somática ya diferenciada a ovocitos que carecían de DNA nuclear, para iniciar nuevamente el desarrollo embrionario, con lo que se consiguió obtener clones del donador de la célula somática [51]. Una alternativa al nacimiento de un clon es la derivación de células troncales embrionarias a partir de embriones humanos que se han producido después del trasplante nuclear de célula somática [52]. Existe una recomendación de la Organización de las Naciones Unidas para no realizar el implante de embriones humanos resultado del trasplante nuclear de célula somática.

La evidencia de que un núcleo de célula diferenciada que se trasplanta en un ovocito puede regresar a un estado compatible con el desarrollo temprano estimuló a los investigadores a buscar alternativas para reprogramar el núcleo de una célula diferenciada a un estadio primitivo. La identificación de factores transcripcionales que mantienen el estado pluripotencial permitió que en el 2006, mediante un estudio exhaustivo en donde se probó su expresión en distintas combinaciones, se lograra la reprogramación de fibroblastos de ratón a células pluripotenciales por la expresión de cuatro factores de transcripción: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc [53]. En 2007 se consiguieron células pluripotenciales inducidas (iPSC) de humano [54,55]. El proceso de reprogramación fue muy poco eficiente al inicio y utilizó retrovirus o lentivirus, los cuales se integran al genoma nuclear de la célula somática. Actualmente se pueden utilizar virus no integrativos, plásmidos, RNA mensajeros, microRNAs, proteínas que se insertan a la célula o moléculas pequeñas (revisado en [56]) con el mismo fin. Las iPSC deben cumplir con las características de pluripotencia después de la reprogramación: expresar marcadores moleculares como Oct4, Sox2, Nanog, SSEA3, SSEA4, TRA 1-60, TRA 1-81, desmetilar los promotores de Oct4 y Nanog, diferenciar a derivados de las tres capas germinales *in vitro*, formar teratomas y poseer un cariotipo estable. Adicionalmente, se debe mostrar que los transgenes se han silenciado y el programa de pluripotencia endógeno es el que prevalece.

Tal vez la aplicación más directa de las iPSC sea la terapia celular para la propia persona (Fig. 3), ya que las células reprogramadas no presentarían rechazo inmunológico, lo que es común en los trasplantes alogénicos que se realizan en la actualidad entre un donador y receptor que son histocompatibles. Sin embargo, hay que considerar que las iPSC pueden formar teratomas si se mantienen indiferenciadas, lo cual puede ser un riesgo para el paciente. Es por esto que el proceso de diferenciación debe ser lo más refinado y preciso posible. Otro aspecto

a considerar es que las iPSC serían por el momento más útiles para el tratamiento de enfermedades crónicas, ya que un accidente que cause un daño agudo no permitiría la reprogramación y diferenciación, que pueden ser procesos lentos. No obstante, en Japón se han iniciado ensayos clínicos fase 1 para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad. Las iPSC de los pacientes se diferencian a células del epitelio pigmentado de la retina y se van a implantar intraocularmente. El objetivo de este ensayo es conocer si hay problemas colaterales asociados al procedimiento, no la eficacia terapéutica.

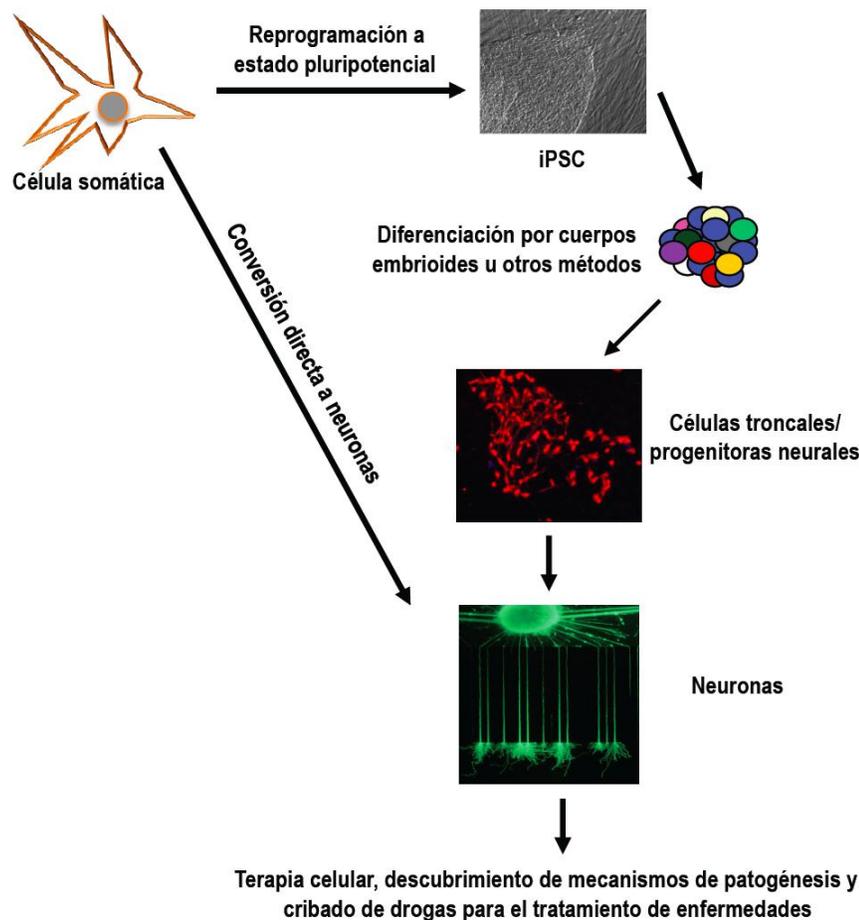


Fig. 3. Generación de neuronas por reprogramación de células somáticas a estado pluripotencial o por conversión directa y su posible utilidad en el tratamiento de enfermedades. La célula somática, que representa un fibroblasto, se reprograma para generar células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC), que posteriormente pueden diferenciarse, mediante cuerpos embrioides u otros métodos, para producir células troncales/progenitoras neurales capaces de generar neuronas. Alternativamente, la expresión factores transcripcionales neuronales permite la conversión directa de

fibroblasto a neurona. Si la célula somática proviene de un paciente, se pueden obtener neuronas que se pueden trasplantar en la propia persona sin rechazo inmunológico, siempre que se tengan las condiciones de bioseguridad apropiadas. Además, las neuronas derivadas de pacientes pueden ayudar a estudiar de manera detallada las alteraciones a nivel celular que contribuyen a la patogénesis, sobre todo en padecimientos esporádicos. Diseñando ensayos adecuados, se pueden identificar moléculas que permitan mejorar las funciones celulares o evitar la degeneración.

Sin embargo, hay otras posibles aplicaciones de las iPSC que podrían ser más generales y no ayudar solamente a un paciente. Como se mencionó, existen protocolos para inducir la diferenciación hacia subtipos neuronales partiendo de células pluripotenciales. Si se piensa que la célula somática proviene de un paciente con una enfermedad para la que no hay cura, se pueden hacer estudios comparativos de la diferenciación, la fisiología y la supervivencia de las neuronas diferenciadas *in vitro* y compararlas con neuronas de personas sanas, permitiendo conocer mecanismos de patogénesis. Si existen diferencias, se pueden diseñar estrategias que permitan incidir positivamente en el progreso de la patología. La segunda posibilidad es diseñar ensayos que reporten el efecto deseado en las neuronas diferenciadas de las iPSC de pacientes, para realizar cribados a gran escala de compuestos químicos para identificar moléculas que prevengan la disfunción o la degeneración de neuronas.

### **La conversión directa de células somáticas a neuronas**

La reprogramación a estado pluripotencial de células somáticas motivó que se empezara a estudiar el efecto de expresar en fibroblastos factores de transcripción que se expresan en neuronas. El resultado fue la conversión directa de fenotipo de fibroblasto a neuronas que disparan potenciales de acción y presentan todos los marcadores moleculares de las células nerviosas [57-59]. Más recientemente, la conversión de astrocitos residentes en el cerebro de roedores a neuronas fue reportada [60].

### **Conclusiones**

Los avances en nuestro entendimiento de los procesos de diferenciación neuronal han permitido establecer eventos fundamentales durante el desarrollo del Sistema Nervioso. Esta información ha sido contrastada con la neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos. Sin embargo, hasta el momento no es posible inducir la diferenciación neuronal dirigida en espacio y tiempo a partir de las CTPN residentes en el cerebro. Esta situación podría cambiar si se confirma que la conversión directa de astrocitos a neuronas puede ocurrir *in vivo*. Otra alternativa para poder tener neuronas que eventualmente se puedan trasplantar en pacientes

es la reprogramación a estado pluripotencial con la posterior diferenciación neuronal. Las neuronas que se produzcan a partir de tejido de pacientes pueden contribuir al diseño de estrategias para, en el largo plazo, ayudar en el tratamiento de diversas afecciones del Sistema Nervioso Central.

### Agradecimientos

El trabajo experimental en el laboratorio de I.V. es subvencionado por donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (Papiit IN208713) y el Conacyt (CB09/131281). Los autores agradecen a Adolfo López-Ornelas, Vicente Arbesú, Rolando Lara Rodarte, Ricardo Hernández y José Bargas algunas imágenes incluidas en este trabajo. I. E.-A. es becaria postdoctoral de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM.

### Referencias

1. Mayani, H. (2003). *Arch. Med. Res.* **34**, 3-15.
2. Rossant, J. (2007). *Repr. Fert. Dev.* **19**, 111-118.
3. Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). *Nature* **292**, 154-156.
4. Martin, G. R. (1981). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 7634-7638.
5. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). *Science* **282**, 1145-1147.
6. Smith, J. L., and Schoenwolf, G. C. (1997). *Trends Neurosci.* **20**, 510-517.
7. Sadler, T. W. (2005). *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **135C**, 2-8
8. Gage, F. H. (2000). *Science* **287**, 1433-1438.
9. Bertrand, N., Castro, D. S., and Guillemot, F. (2002). *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 517-530.
10. Altman, J., and Das, G. D. (1965). *J. Comp. Neurol.* **124**, 319-335.
11. Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1993). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 2074-2077.
12. Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, *et al.* (1998). *Nat. Med.* **4**, 1313-1317.
13. Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., *et al.* (2001). *Nature* **409**, 714-720.
14. Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., *et al.* (2001). *Cell* **104**, 365-376.
15. Morrison, S. J. (2001). *Curr. Biol.* **11**, R349-351.
16. Morrison, S. J. (2001). *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 666-672.
17. Ma, Q., Kintner, C., and Anderson, D. J. (1996). *Cell* **87**, 43-52.
18. Farah, M. H., Olson, J. M., Sucic, H. B., *et al.* (2000) Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* **127**, 693-702.

19. Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., *et al.* (2001). *Neuron* **31**, 757-767.
20. Reynolds, B. A., and Weiss, S. (1992). *Science* **255**, 1707-1710.
21. Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., *et al.* (1996). *Genes Dev.* **10**, 3129-3140.
22. Molina-Hernandez, A., and Velasco, I. (2008). *J. Neurochem.* **106**, 706-717.
23. Rodriguez-Martinez, G., Velasco, I., Garcia-Lopez, G., *et al.* (2012). *Neuroscience* **216**, 10-17.
24. Molina-Hernandez, A., Rodriguez-Martinez, G., Escobedo-Avila, I., and Velasco, I. (2013). *Neural Dev.* **8**, 4.
25. Rodriguez-Martinez, G., Molina-Hernandez, A., and Velasco, I. (2012). *PLoS One* **7**, e43797.
26. Rodriguez-Rivera, N. S., Molina-Hernandez, A., Sanchez-Cruz, E., *et al.* (2009). *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 947-953.
27. Merkle, F. T., and Alvarez-Buylla, A. (2006). *Curr. Op. Cell Biol.* **18**, 704-709.
28. Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., *et al.* (1999). *Cell* **96**, 25-34.
29. Chiasson, B. J., Tropepe, V., Morshead, C. M., and van der Kooy, D. (1999). *J. Neurosci.* **19**, 4462-4471.
30. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., *et al.* (1999). *Cell* **97**, 703-716.
31. Laywell, E. D., Rakic, P., Kukekov, V. G., *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13883-13888.
32. Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., *et al.* (2014). *Physiol. Rev.* **94**, 991-1026.
33. Bain, G., Ray, W. J., Yao, M., and Gottlieb, D. I. (1996). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **223**, 691-694.
34. Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., *et al.* (1996). *Mech. Dev.* **59**, 89-102.
35. Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., *et al.* (2000). *Neuron* **28**, 31-40.
36. Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., *et al.* (2003). *Nat. Biotech.* **21**, 183-186.
37. Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., *et al.* (2000). *Nat. Biotech.* **18**, 675-679.
38. Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., and Jessell, T. M. (2002). *Cell* **110**, 385-397.
39. Cambray, S., Arber, C., Little, G., *et al.* (2012). *Nat. Comm.* **3**, 841.
40. Amoroso, M. W., Croft, G. F., Williams, D. J., *et al.* (2013). *J. Neurosci.* **33**, 574-586.
41. Lopez-Gonzalez, R., Kunckles, P., and Velasco, I. (2009). *Cell Transplant.* **18**, 1171-1181.
42. Lopez-Gonzalez, R., and Velasco, I. (2012). *Arch. Med. Res.* **43**, 1-10.

43. Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, J. A., *et al.* (2002). *Nature* **418**, 50-56.
44. Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., *et al.* (2005). *J. Clin. Inv.* **115**, 102-109.
45. Roy, N. S., Cleren, C., Singh, S. K., *et al.* (2006). *Nat. Med.* **12**, 1259-1268.
46. Rodriguez-Gomez, J. A., Lu, J. Q., Velasco, I., *et al.* (2007). *Stem Cells* **25**, 918-928.
47. Hedlund, E., Pruszek, J., Lardaro, T., *et al.* (2008). *Stem Cells* **26**, 1526-1536.
48. Wernig, M., Zhao, J. P., Pruszek, J., *et al.* (2008) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 5856-5861.
49. Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., *et al.* (2011). *Nature* **480**, 547-551.
50. Grealish, S., Diguett, E., Kirkeby, A., *et al.* (2014). *Cell Stem Cell* **15**, 653-665.
51. Campbell, K. H., McWhir, J., Ritchie, W. A., and Wilmut, I. (1996). *Nature* **380**, 64-66.
52. Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., *et al.* (2013). *Cell* **153**, 1228-1238.
53. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). *Cell* **126**, 663-676.
54. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., *et al.* (2007). *Cell* **131**, 861-872.
55. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., *et al.* (2007). *Science* **318**, 1917-1920.
56. Velasco, I., Salazar, P., Giorgetti, A., *et al.* (2014). *Stem Cells* **32**, 2811-2817.
57. Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., *et al.* (2010). *Nature* **463**, 1035-1041.
58. Caiazzo, M., Dell'Anno, M. T., Dvoretzkova, E., *et al.* (2011). *Nature* **476**, 224-227.
59. Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., *et al.* (2011). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 10343-10348.
60. Torper, O., Pfisterer, U., Wolf, D. A., *et al.* (2013). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 7038-7043.

## Semblanza del Dr. Iván Velasco Velázquez



Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto de Fisiología Celular-Neurociencias.

El Dr. Iván Velasco obtuvo el grado de Químico Farmacéutico Biólogo por la Facultad de Química de la UNAM en 1993 y el de doctor en Bioquímica también en la UNAM en 1998. Realizó una estancia postdoctoral en el laboratorio del Dr. Ricardo Tapia en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y en el año 2000 obtuvo la beca *Pew Latin American Fellow* para realizar una estancia en el laboratorio del Dr. Ron McKay en los *National Institutes of Health* en Bethesda, Maryland, EUA. Actualmente el Dr. Velasco es Investigador Titular “B” definitivo de la División de Neurociencias, SNI II.

Las áreas de interés de su laboratorio incluyen el entendimiento de los mecanismos básicos de autorrenovación y diferenciación de células troncales neurales provenientes del cerebro en desarrollo, así como la diferenciación de neuronas partiendo de células troncales embrionarias, para trasplantarlas en modelos animales de enfermedades neurológicas. La caracterización de esta terapia celular incluye pruebas conductuales para establecer su efectividad.

El Dr. Velasco ha publicado 35 artículos en revistas indizadas, que han recibido más de 2700 citas bibliográficas. Ha participado en 5 capítulos de libro y en artículos de difusión. Fue co-editor del libro “Células Troncales y Medicina Regenerativa”, que se publicó en 2011 y se reimprimió en 2013. Su trabajo ha recibido financiamiento de instituciones nacionales y extranjeras.

En lo relativo a la docencia y formación de recursos humanos, el Dr. Velasco ha dirigido seis tesis de licenciatura, seis de maestría y cuatro de doctorado.

Actualmente el Dr. Iván Velasco es vicepresidente de la Sociedad Mexicana para la Investigación en Células Troncales, A.C.



Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 205-222, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## **LA CÉLULA PROPONE Y LA MITOCONDRIA DISPONE: ESTRÉS, LONGEVIDAD Y MUERTE CELULAR**

### **THE CELL PROPOSES, THE MITOCHONDRIA DISPOSES: STRESS, LONGEVITY AND CELL DEATH**

Fabiola Jaimes-Miranda, José L. Aguilar López, Raymond Laboy y Soledad Funes

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D.F. Teléfono: (+52-55) 56225679. Fax (+52-55) 56225611  
Dirección de correspondencia: Soledad Funes, sfunes@ifc.unam.mx

### **RESUMEN**

Las mitocondrias son organelos esenciales para todas las células eucariontes. La función más estudiada de estos compartimentos es la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, están involucrados en una gran variedad de funciones celulares y la comunicación que guardan con el citoplasma y el resto de los organelos es fundamental para que la célula se desarrolle de manera adecuada. Uno de los procesos fisiológicos que recientemente se ha vinculado con las mitocondrias y que actualmente se está estudiando con mucho interés es el envejecimiento, un proceso paulatino de acumulación de daños que eventualmente desencadenan la muerte celular. Este proceso depende de que exista un balance entre la biogénesis, función y degradación mitocondrial.

En el presente trabajo se hace una pequeña revisión de cómo es que ciertas vías de señalización conservadas detectan cambios en el ambiente y actúan sobre las mitocondrias quienes finalmente regulan y determinan el destino celular.

**Palabras clave:** Mitocondria / Estrés / Longevidad / Envejecimiento

### **ABSTRACT**

Mitochondria are essential organelles for all eukaryotic cells. Their most studied function is the production of energy by oxidative phosphorylation. In addition, they are involved in several cellular processes, and the communication they maintain between cytoplasm and other organelles is fundamental for the proper development of the cell. One of the physiological mechanisms that has been related to mitochondria and is being studied with great interest in recent years is aging, a progressive accumulation of damage that eventually triggers cell death. This process depends on a balance between mitochondrial biogenesis, function and degradation.

In the present work we summarize how some conserved signaling pathways detect change in the environment and relay on mitochondria, which finally regulate and determine cellular fate.

**Keywords:** Mitochondria / Stress / Longevity / Aging

### **En busca de la fuente de la eterna juventud**

Todos los seres vivos envejecemos. Cada uno de nosotros ha presenciado cómo nuestros padres y abuelos han cambiado físicamente con el paso de los años. Y no sólo ellos, seguramente también hemos notado cuando revisamos el álbum de fotos familiares cómo nuestro propio cuerpo es distinto. Y tal vez porque es una de las pocas cosas de las que tenemos la certeza de que nos ocurrirá, no hay época en la que el hombre no haya intentado comprender qué es lo que ocasiona que nuestros cuerpos envejezcan y cómo poder detener el paso del tiempo para permanecer jóvenes y fuertes. Por decirlo de alguna manera, el hombre ha buscado incansablemente la fuente de la eterna juventud.

En México, la esperanza de vida al nacer (es decir, el número estimado de años que vivirá una persona a partir de su nacimiento) ha aumentado dramáticamente. En 1930 era de únicamente 34 años y se estima que en el 2030 alcance los 77 años (Fig. 1) [1,2]. Sin duda algo que ha influido de forma muy importante estas cifras, ha sido el desarrollo médico y tecnológico que acompañó a nuestra sociedad a lo largo del siglo XX. El hecho de que en la actualidad "vivamos más", hace que la sociedad tenga que contender con padecimientos asociados con los cuerpos envejecidos de manera que los individuos no sólo vivan más, sino que vivan bien y en condiciones ideales para que también sean económicamente productivos un mayor número de años.

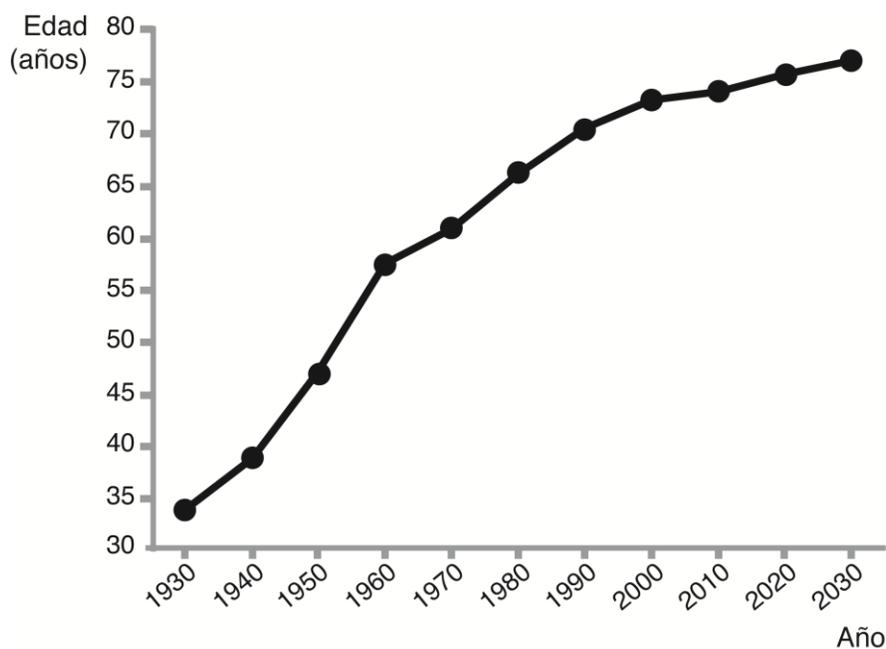


Figura 1. La esperanza de vida al nacer en México se ha duplicado desde 1930. Los avances tecnológicos y médicos del último siglo se han reflejado en el aumento de la esperanza de vida de las poblaciones de todo el mundo. En el caso de México, se ha incrementado de 33.9 años en 1930 a 74.7 años en 2014 y se estima que en el 2030 llegará a 77 años. Esto se refleja en que en 2014 aproximadamente el 10% de la población total tenía 60 años o más. Datos obtenidos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática y del Consejo Nacional de Población (México).

Así las investigaciones sobre el envejecimiento se han enfocado en el estudio de organismos modelo tratando de que el conocimiento generado pueda aplicarse posteriormente en nosotros. Evidentemente modelos cercanos al ser humano son mamíferos como ratones e incluso monos, en los que se puede observar que el paso del tiempo causa modificaciones en los individuos que son muy similares a las que nos ocurren. Sin embargo, el uso de este tipo de modelos presenta complicaciones técnicas, presupuestales y éticas que han hecho que su uso no siempre sea posible. Por otro lado, organismos más simples como el nematodo *Caenorhabditis elegans* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han utilizado para identificar procesos conservados que de alguna manera alteren el envejecimiento celular [3].

### **Pan, vino, cerveza y envejecimiento**

Las levaduras han sido utilizadas por el hombre para producir panes, vinos y cervezas desde hace miles de años. En nuestra sociedad, el término "levadura" es casi siempre utilizado para referirse a *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo descrito en cultivos de malta en 1837 y que fue ligada a la producción de cerveza (Revisado en [4, 5]). Aunque probablemente su descubrimiento como agente leudante haya sido accidental cuando cereales cultivados fueron fermentados por levaduras provenientes del aire [6], lo cierto es que actualmente es uno de los componentes fundamentales en la producción de panes, vinos y cervezas de casi cualquier cultura.

Para los investigadores la levadura no sólo es fundamental para producir elementos de su menú, sino que ha sido desde principios del siglo XX uno de los organismos eucariontes más populares para estudiar procesos celulares. Esto se debe a que combina una serie de características que hacen que estos mecanismos fundamentales puedan ser estudiados de manera muy sencilla: es un organismo unicelular que puede crecer en condiciones controladas de laboratorio de forma muy eficiente y al mismo tiempo su manipulación genética es relativamente simple, por lo tanto fue uno de los primeros organismos en los que fue posible identificar la función bioquímica del producto de un gen (Revisado en [7]).

Las levaduras, como todos los seres vivos, también envejecen; aunque su ciclo de vida se analiza de una manera distinta a como se haría con otros organismos. En el laboratorio, un cultivo de levadura que crece en un medio rico en glucosa, pasa por tres etapas diferentes: primero por una etapa logarítmica en la que el metabolismo es fundamentalmente glucolítico; cuando el azúcar

comienza a consumirse y escasea en el medio ocurre el llamado cambio diáuxico y las células del cultivo pasan a un metabolismo respiratorio, finalmente se alcanza una fase estacionaria en la cual las células dejan de dividirse y pueden permanecer así hasta que mueren [8]. El estudio de la vida de las levaduras se ha dividido en dos para una mejor comprensión del fenómeno: 1) la vida replicativa de una célula, que se refiere al número de divisiones que una sola célula puede llevar a cabo (es decir, durante la fase logarítmica de un cultivo [9]); y 2) la vida cronológica, que es el tiempo en que una célula que no se divide permanece viable (es decir, durante la fase estacionaria de un cultivo, [10] (Revisado en [3]. Estos dos tipos de "vida" en las levaduras pueden ser homologados a distintos mecanismos de "vida" en nuestras células. Por ejemplo, el estudio de la vida cronológica de una levadura, puede ayudarnos a entender los procesos que ocurren en neuronas y células musculares, que son células de nuestro cuerpo que no se dividen.

### **¿Envejecimiento o longevidad?**

Para entender cuáles son los mecanismos que subyacen el envejecimiento, una de las primeras metas de los estudios sobre el tema fue la búsqueda de un gen (o varios genes) que lo controlaran. Sin embargo, el "envejecimiento" ha resultado ser un proceso mucho más complejo de lo que se imaginó y no existe sólo un gen que al encenderse o apagarse desencadene irreversiblemente la vejez. Lo que ha ocurrido es que se han identificado muchos genes que alteran la longevidad de los individuos. Esto ha producido que en la literatura puedan encontrarse estos dos términos utilizados de manera indistinta y es importante distinguir el significado de cada uno. El envejecimiento es un proceso biológico intrínseco, es el declive funcional que sufre cualquier individuo a través del tiempo. La longevidad en cambio, es un parámetro, es decir la cantidad de tiempo que un individuo permanece vivo en ausencia de un factor extrínseco que le cause la muerte. El envejecimiento y la longevidad ocurren entonces a tasas inversamente proporcionales [11].

### **¿Por qué envejecemos?**

Como mencionamos anteriormente, el envejecimiento es un proceso sumamente complejo que ha sido vinculado a una gran variedad de funciones celulares (o a que una gran variedad de funciones celulares se alteren) que muy probablemente actúen de manera conjunta. Entre estos se encuentran el control de la longitud de los telómeros, la estabilidad génica, la fuerza física, la fecundidad, el riesgo a presentar enfermedades congénitas, entre otros. A nivel

celular, una de las hipótesis que más fuerza ha tomado es la que postula que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son los principales agentes que producen daños irremediables a las células y eventualmente desencadenan el envejecimiento [12]. La producción de ROS ocurre en gran medida en la mitocondria, en donde se generan como un producto secundario del proceso de respiración celular. Entonces, el alterar el metabolismo oxidativo mitocondrial a través de alteraciones en el DNA mitocondrial (mtDNA), en las proteínas encargadas del proceso o de los lípidos que forman a este organelo celular, inicia un círculo vicioso en el que problemas en la respiración celular producen más ROS, los cuales producen un daño cada vez mayor (Revisado por [13]). Todos estos cambios desencadenan entonces un envejecimiento inducido por estrés oxidativo (Fig. 2) [14].

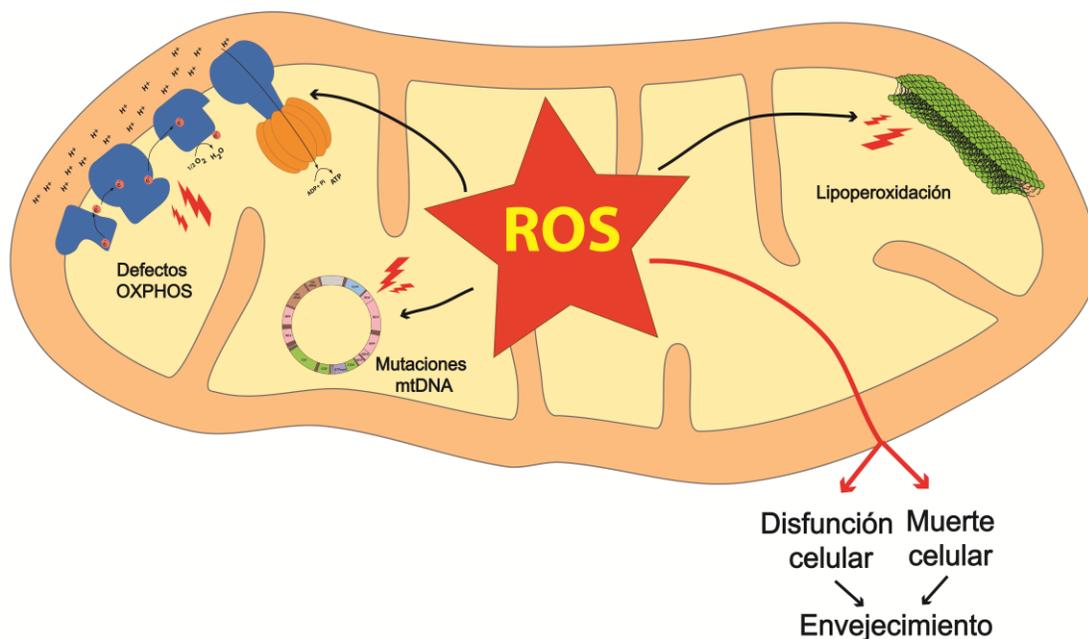


Figura 2. El envejecimiento inducido por estrés oxidativo afecta diversas funciones en la mitocondria. El desbalance en las concentraciones mitocondriales de especies reactivas de oxígeno (ROS, estrella roja) produce daños en el funcionamiento del sistema OXPHOS, induce la acumulación de mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA), así como la oxidación de lípidos en la membrana interna y externa de la mitocondria. Si la célula es incapaz de contener con estos daños, se producen una disfunción celular, envejecimiento prematuro y finalmente la muerte.

Las mitocondrias son organelos celulares esenciales que cumplen con una enorme cantidad de funciones dentro de la célula, entre ellas, la transducción de señales, la conversión de metabolitos y la biosíntesis de moléculas orgánicas. Sin embargo, una de sus funciones más estudiadas es la de proveer a la célula de ATP a través de un proceso conocido como la fosforilación oxidativa (OXPHOS). El sistema OXPHOS consiste de complejos de proteínas que transfieren electrones a partir de sustratos de alta energía como el NADH y el FADH<sub>2</sub> hasta oxígeno molecular. La transferencia de electrones está acoplada a una translocación de protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal que genera un gradiente a través de la membrana interna mitocondrial (Revisado en [15]). Además, la cadena respiratoria es la mayor fuente de ROS en una célula: normalmente la donación de electrones al oxígeno se lleva a cabo por el complejo IV o citocromo c oxidasa, sin embargo, los electrones pueden reaccionar prematuramente con el oxígeno en una reacción no enzimática generando así ROS. Hay muchas evidencias que apuntan a que el balance entre la función, la biogénesis y la degradación mitocondrial juega un papel preponderante durante el envejecimiento celular (Fig. 2) [13, 16-19].

### **¿Comer menos hace realmente que vivamos más?**

Experimentalmente, uno de los métodos más exitosos para aumentar la longevidad en organismos modelo (levaduras, nematodos, insectos y mamíferos) ha sido el implementar dietas de restricción calórica (CR). Este tipo de tratamientos disminuye la incidencia de diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y atrofia cerebral [20-22]. Se ha observado que la CR activa la biogénesis mitocondrial y también la mitofagia (un proceso mediante el cual la célula degrada selectivamente mitocondrias que han dejado de funcionar), asegurando que la masa mitocondrial se encuentre en óptimas condiciones de funcionamiento y por lo tanto que no se produzcan ROS en concentraciones dañinas (Revisado por [13]).

En todos los organismos estudiados (desde levaduras hasta mamíferos) la disminución en la disponibilidad de nutrientes tiene efecto sobre dos vías paralelas de resistencia a estrés y longevidad: la vía de TOR y la vía de RAS (Fig. 3). La regulación de estas dos vías puede incrementar hasta tres veces la esperanza de vida de las levaduras [23, 24].

La vía de señalización TOR ha desatado el interés de la comunidad científica en los últimos años debido a que en diferentes organismos está

involucrada en la regulación de la longevidad. Inhibir la señalización por ésta vía incrementa la esperanza de vida en levaduras (cronológica y replicativa), en nematodos, en moscas y en ratones (Revisado en [24]). La vía de señalización TOR controla varios aspectos de la fisiología celular como la biogénesis ribosomal, la traducción, la autofagia, el crecimiento y la proliferación celular [25], sin embargo, aún es poco claro cuáles aspectos de la señalización de esta vía contribuyen al envejecimiento y a la regulación de la esperanza de vida [26].

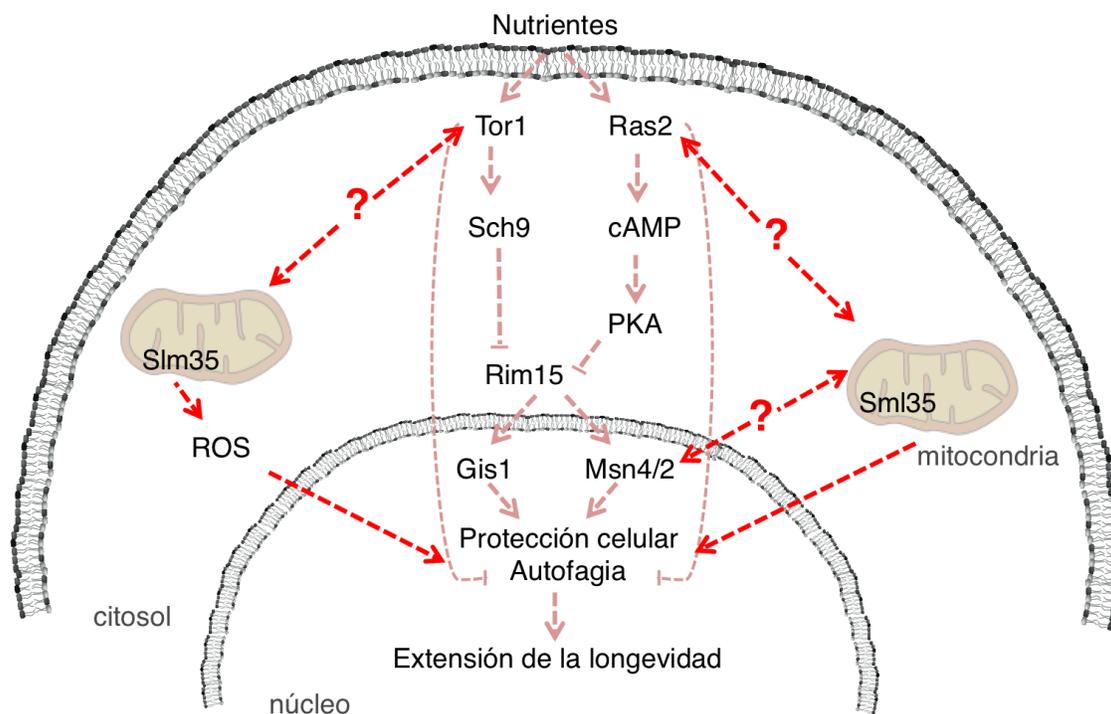


Figura 3. Vías regulatorias de la longevidad. En levadura la señalización en función de la detección de nutrientes está regulada por Tor1, Sch9 y Ras2 a través de la inhibición de Rim15. En condiciones de bajas concentraciones de nutrientes Rim15 activa factores transcripcionales como Msn2, Msn4 y Gis1, los cuales a su vez activan genes de protección celular y respuesta a estrés, permitiendo con ello la extensión de la longevidad. La respuesta a ROS mitocondriales a través de Slm35 podría ocurrir vía los reguladores centrales de señalización Tor1 y Ras2, o también a través de la activación o inhibición de otros factores, aún desconocidos, que tienen un efecto directo sobre la respuesta celular y la longevidad.

La proteína central de la vía y que le da nombre es Tor1, una cinasa de serinas y treoninas conservada que funciona en procesos de detección de

nutrientes y como regulador del crecimiento celular y el envejecimiento [27, 28]. En levaduras existen dos genes parálogos, *TOR1* y *TOR2*, cuyos productos proteicos están involucrados en la formación de dos complejos de señalización independientes que controlan el crecimiento celular de maneras distintas: TORC1 y TORC2 [27, 29]. TORC1 regula la biogénesis ribosomal y por lo tanto la traducción y TORC2 controla el ciclo celular y la dinámica del citoesqueleto [30]. TORC1 puede formarse utilizando a cualquiera de las dos proteínas (Tor1 o Tor2), en cambio TORC2 únicamente puede formarse con Tor2. Tor1 tiene entonces algunas funciones redundantes con Tor2, por lo que una mutante  $\Delta tor1$  es viable en condiciones normales de laboratorio y una  $\Delta tor2$  no. Esto ha facilitado el estudio en levaduras de las dos rutas de señalización TOR y por lo tanto su caracterización funcional.

TORC1 es capaz entonces de detectar condiciones cambiantes en la disponibilidad de nutrientes. En condiciones de abundancia, TORC1 fosforila directamente a la proteína Sch9 (homóloga de la proteína S6K1 en mamíferos, [31]) que a su vez reprime a la cinasa Rim15. En cambio, en condiciones de carencia de nutrientes, Tor1 se reprime, por lo tanto Sch9 también y Rim15 se activa. Los blancos de Rim15 son fundamentalmente factores de transcripción que regulan las respuestas a estrés y la reconfiguración del metabolismo durante la entrada de las células a una fase estacionaria [23, 32, 33]. Cuando la vía de señalización de Tor1 es activada, preferencialmente se activa el factor de transcripción Gis1 aunque también Msn2 y Msn4. Estos tres factores se han relacionado con un incremento en la longevidad celular [23, 24, 33, 34].

Se ha demostrado que para que exista un aumento en la longevidad celular de mutantes  $\Delta tor1$  es necesario que las mitocondrias estén respirando [35-37]. Además, en ausencia de *TOR1*, se ha visto un incremento en la traducción de los genes de las subunidades de los complejos OXPHOS codificados en el mtDNA y concomitantemente en el consumo de oxígeno durante la fase logarítmica de crecimiento [38, 39]. Efectos similares se han observado en estudios en los que se identificó que genes relacionados con la glucólisis se regulan negativamente y genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ligados también a la respiración) se regulan positivamente al inhibir farmacológicamente la función de TORC1 añadiendo rapamicina [40]. Así, la señalización por TORC1 parece regular la extensión en la longevidad en fases estacionarias de crecimiento, mediante la modulación de la respiración mitocondrial y el consecuente incremento en el potencial de membrana y de ROS durante la fase logarítmica. Por decirlo de

alguna manera, la inhibición de Tor1 durante fases tempranas de crecimiento prepara a las levaduras para que puedan contender mejor con las condiciones estresantes de la fase estacionaria [18, 39]. De la misma manera, si se eleva la cantidad de ROS en un cultivo durante la fase de crecimiento logarítmica (por ejemplo al añadir superóxido), se promueve la longevidad. Se ha propuesto que esto se debe a que la presencia de ROS en etapas de crecimiento logarítmicas, funcionan como una señal de adaptación que programa la disminución del potencial de membrana y de ROS durante la fase estacionaria y por lo tanto promueven la longevidad [37].

De manera similar a lo que se observa en una mutante  $\Delta tor1$ , al eliminar *SCH9* se desata un incremento en la respiración celular y por lo tanto en la longevidad. Sch9 funciona río abajo de Tor1 y es uno de los mediadores más importantes de la expresión de las proteínas de los complejos OXPHOS y por lo tanto funciona también como un regulador de la longevidad celular [39, 41].

Una segunda vía de señalización sensible a cambios en la disponibilidad de nutrientes es la vía de RAS. Esta vía incluye a las proteínas Ras1, la adenilato ciclasa Cyr1 y una proteína cinasa A (PKA). En condiciones en donde la glucosa está disponible, Ras1 activa a la adenilato ciclasa quien a su vez activa a la proteína cinasa A, inhibiendo entonces la actividad de Rim15. De la misma manera a lo que ocurre en la vía de TOR, la carencia de nutrientes (en particular una disminución en la disponibilidad de glucosa) inhibe a Ras1 y por lo tanto se activan Rim15 y río abajo los factores transcripcionales Msn2, Msn4 y en menor medida Gis1 (Fig. 3, Revisado en [24]).

A pesar de que existe una relación entre las vías de TOR y RAS y la biogénesis mitocondrial, cómo es que estas vías de señalización regulan la respiración y la acumulación de metabolitos y cómo es que esto se relaciona con la esperanza de vida son procesos que aún permanecen sin una explicación clara (Fig. 3).

### **Un nuevo engrane en la maquinaria de envejecimiento: SIm35**

Nuestro interés en estudiar a la proteína SIm35 y su relación con las vías de TOR y RAS comenzó fortuitamente. Originalmente nos interesamos en ella porque fue identificada en un estudio masivo en *S. cerevisiae* que buscaba genes relacionados con la biogénesis mitocondrial [42] y no se le conocía ninguna función particular.

Slm35 es una proteína de 327 aminoácidos a la que no se le predicen cruces transmembranales (es decir, no es una proteína de membrana) y que en estudios *in vitro* hemos corroborado que se trata de una proteína mitocondrial. Un análisis computacional de su secuencia de aminoácidos la ubica dentro de la superfamilia de las proteínas denominadas escramblasas, que reorganizan la composición lipídica de membranas en todos los organismos eucariontes. En los humanos existen cuatro genes que codifican para escramblasas diferentes (hPLSCR1 a 4). hPLSCR1 fue la primera que se describió y es capaz de mover fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS) del interior al exterior de la membrana plasmática. En condiciones de estrés, se expone PS al exterior de la membrana externa y esto es esencial para procesos de fagocitosis, coagulación y activación de respuestas antiinflamatorias [43]. La escramblasa hPLSCR3 se localiza en mitocondrias y se encarga de la translocación de cardiolipina (CL) de la membrana interna a la membrana externa del organelo. Esta translocación es necesaria para desencadenar mecanismos de muerte celular por apoptosis y mitofagia [44]. Estos datos existentes, nos permitieron suponer que Slm35 podría estar involucrada en el metabolismo de lípidos y su transporte a través de las membranas mitocondriales, un proceso muy pobremente estudiado en levaduras [45].

Ante la poca información que teníamos sobre Slm35, decidimos utilizar herramientas bioinformáticas para identificar proteínas que pudieran estar relacionadas con ella. Como un primer acercamiento, construimos una red de interacciones genéticas a partir de valores de perfiles de expresión obtenidos de microarreglos de *S. cerevisiae* utilizando el algoritmo ARACNE [46]. De esta red se destacan un grupo de genes que codifican proteínas mitocondriales que participan en procesos de estrés oxidativo, así como los genes *SCH9* y *RAS2* que participan en procesos de respuesta a estrés y longevidad celular.

Aprovechamos las ventajas de *S. cerevisiae* y eliminamos el gen *SLM35* y analizamos su fenotipo en respuesta a distintas condiciones, en particular a condiciones de estrés oxidativo por la información que nos había dado la red de interacciones genéticas. Estos experimentos nos permitieron observar que la cepa  $\Delta slm35$  es más resistente a condiciones de estrés oxidativo en comparación con una cepa silvestre. Este fenotipo de resistencia es independiente de las condiciones metabólicas de la célula (es decir, si están fermentando o respirando) y se observa tanto al analizar la fase logarítmica como estacionaria del crecimiento celular. La levadura *S. cerevisiae* ha desarrollado mecanismos adaptativos que le

permiten sobrevivir bajo distintas condiciones de estrés [47], por lo que decidimos probar el efecto de la eliminación de *Slm35* en condiciones de estrés por choque de calor, encontrando el mismo fenotipo de resistencia observado en condiciones de estrés oxidativo.

La presencia de *SCH9* y *RAS2* como vecinos sumamente cercanos a *SLM35* en la red de interacciones genéticas, permite suponer que *Slm35* puede estar participando de alguna manera en la vía de señalización de Tor1/Ras2. Con el fin de determinar entonces la participación de *Slm35* en las vías de Tor1 y Ras2, realizamos dobles mutantes en las cuales eliminamos simultáneamente a *SLM35* y un gen adicional (ya sea *TOR1* o *RAS2*). A cada una de estas dobles mutantes las sometimos a condiciones de estrés oxidativo y de choque por calor y analizamos su fenotipo. De manera interesante encontramos que la eliminación conjunta de *SLM35* y *TOR1* produce un fenotipo letal tanto en condiciones de estrés oxidativo como térmico, esto quiere decir que cuando eliminamos a ambos genes simultáneamente las células son incapaces de contender con el estrés y se mueren. Esto resulta de particular interés ya que la eliminación de cada uno de los genes de manera independiente produce el fenotipo opuesto: es decir, una cepa  $\Delta slm35$  y una cepa  $\Delta tor1$  crecen mejor que la cepa silvestre en estas dos condiciones de estrés, pero una cepa  $\Delta slm35 / \Delta tor1$  se muere.

El caso de la relación entre *SLM35* y *RAS2* es un poco diferente: en condiciones estándar de laboratorio la eliminación de *RAS2* extiende la longevidad celular, es decir la cepa  $\Delta ras2$  envejece más lento que la cepa silvestre; la eliminación de *SLM35* en cambio parece tener un efecto neutral sobre la longevidad, es decir la cepa  $\Delta slm35$  tiene un tiempo de vida media igual al de la silvestre. Al analizar el crecimiento de la doble mutante  $\Delta slm35 / \Delta ras2$  se observa un fenotipo intermedio, es decir que la longevidad de esta cepa está disminuida al compararla con la cepa sencilla  $\Delta ras2$ . Esto indica que *Slm35* es necesaria para que *Ras2* pueda ejercer su efecto sobre la longevidad.

Hasta ahora sabemos que *Slm35* está involucrada en mecanismos de respuesta a estrés y longevidad celular, sin embargo, no conocemos exactamente a través de qué vía o mecanismo ocurre.

Una posibilidad es que la eliminación de *SLM35* promueva la mitofagia celular. Como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo celular debe existir un balance entre la función, la biogénesis y la degradación mitocondrial. Si alguno de estos procesos se altera, se desencadena el envejecimiento. El producir

un efecto sobre la mitofagia, imposibilitaría que cualquier problema en la red mitocondrial sea identificado y eliminado antes de causar un daño mayor. En nuestros experimentos observamos también una interacción genética negativa con varios genes que participan en la autofagia. Es decir, la eliminación de *SLM35* o genes relacionados con autofagia (mutantes sencillas) promueve la supervivencia en condiciones de estrés térmico; sin embargo, al eliminar *SLM35* y cualquiera de estos genes simultáneamente (dobles mutantes) la supervivencia se encuentra muy por debajo de la de la cepa silvestre. Esto nos lleva a suponer que *SLM35* y la autofagia (probablemente la mitofagia) participan en la misma vía de respuesta a estrés celular.

Otra posibilidad es que *Slm35* esté relacionada con la activación de ciertas respuestas a través del rearrreglo de la composición lipídica de las membranas mitocondriales. Como se mencionó, *Slm35* aparentemente pertenece a la familia de las escramblasas y su homólogo en humano hPLSCR3 es necesario para la translocación de cardiolipina entre las membranas mitocondriales en respuesta a condiciones de estrés para desencadenar procesos de muerte celular por apoptosis. En este sentido hemos analizado el contenido lipídico de extractos mitocondriales crudos de una cepa silvestre y la mutante  $\Delta slm35$  y observamos que existe una disminución en los niveles de fosfatidil inositol (PI) en la cepa mutante. Pensando en que *Slm35* pueda estar funcionando también translocando lípidos entre las membranas mitocondriales, podemos pensar que condiciones de estrés celular activan mecanismos de remodelamiento de las membranas mitocondriales, en particular sobre el transporte de fosfatidil inositol. Este remodelamiento de la membrana mitocondrial podría estar regulando las vías de Tor1, Ras2 y la mitofagia, contribuyendo al balance entre las funciones mitocondriales de manera que la célula pueda competir frente al estrés y promover la longevidad celular.

## Conclusión

Una de las principales preocupaciones de la humanidad a lo largo de su historia ha sido el extender la esperanza de vida y al mismo tiempo asegurarse de que esa extensión suceda manteniendo la calidad de vida de los individuos. Una cultura de prevención de enfermedades, campañas de vacunación, incremento en el número de hospitales, mejora en las condiciones sanitarias de la población y los dramáticos avances médicos de las últimas décadas, han logrado que la población viva un mayor número de años. En el caso de México la esperanza de vida al nacer se ha doblado desde 1930 (Fig. 1). En esos años las personas morían

principalmente por enfermedades transmisibles tanto respiratorias como gástricas, de manera que cuando fueron controladas alrededor de los años 60's la esperanza de vida se incrementó radicalmente. El aumento en la esperanza y la calidad de vida de la población es un fenómeno que no sólo se observa en México sino que ha ocurrido en el mundo entero.

Todas y cada una de las medidas que de alguna manera han contribuido a aumentar la esperanza y calidad de vida de la población surgieron gracias a una gran cantidad de investigaciones enfocadas fundamentalmente a entender a los organismos patógenos y sus estrategias de transmisión para que posteriormente esos organismos pudieran ser controlados. Los problemas de salud actuales como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas son característicos de una población que cada vez es más vieja, por lo que desde hace ya unos cuantos lustros, el entender cómo es que estas enfermedades se desarrollan ha ocupado una gran cantidad de los presupuestos destinados a la investigación.

Recientemente también se han comenzado a desentrañar los mecanismos que llevan a que una célula y eventualmente un organismo envejezcan. Para esto ha sido y es indispensable el uso de organismos modelo como la levadura ya que facilitan la identificación y el estudio de procesos conservados evolutivamente. Estudiar los procesos de envejecimiento y longevidad desde el punto de vista molecular es fundamental porque aunque llevará tiempo el comprender por completo su funcionamiento y regulación, este conocimiento será el pilar que nos permitirá sostener las investigaciones que darán soluciones específicas para envejecer con una mejor calidad de vida.

### Referencias

1. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, México. *Indicadores Sociodemográficos de México (1930-2000)*, inegi.org.mx
2. Secretaría de Gobernación, México. Consejo Nacional de Población CONAPO. <http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones> (Accessed March 2, 2015).
3. Tissenbaum, H. A., and Guarente, L. (2002). *Dev. Cell* **2**, 9–19
4. Branduardi, P., Dujon, B., Feldmann, H., Gaillardin, C., and Porro, D. *Yeast*, 2nd Ed. (Feldmann, H., ed.), Wiley-Blackwell.
5. Chambers, P. J., and Pretorius, I. S. (2010). *EMBO Rep.* **11**, 914–920.
6. Samuel, D. (1996). *Science* **273**, 488–490.
7. Müller, B., and Grossniklaus, U. (2010). *J Proteomics* **73**, 2054–2063
8. Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., and Singer, R. A.

- (1993). *Microbiol. Rev.* **57**, 383–401.
9. Steinkraus, K. A., Kaeberlein, M., and Kennedy, B. K. (2008). *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**, 29–54.
  10. Fabrizio, P., and Longo, V. D. (2007). *Methods Mol. Biol.* **371**, 89–95.
  11. Piper, P. W. (2006). *Yeast* **23**, 215–226.
  12. Harman, D. (1956). *J Gerontol* **11**, 298–300.
  13. Bereiter-Hahn, J. (2014). *Protoplasma* **251**, 3–23.
  14. Sohal, R. S., and Weindruch, R. (1996). *Science* **273**, 59–63.
  15. Scheffler, I. E. (2007) *Mitochondria*, 2nd Ed, John Wiley & sons. NJ, USA. 462 pp.
  16. Balaban, R. S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). *Cell* **120**, 483–495.
  17. Bereiter-Hahn, J. (2014). *Prog Mol Biol Transl Sci* **127**, 93–131.
  18. Bonawitz, N. D., and Shadel, G. S. (2007). *Cell Cycle* **6**, 1574–1578.
  19. Shadel, G. S. (2008). *Am. J. Pathol.* **172**, 1445–1456.
  20. Anderson, R. M., Shanmuganayagam, D., and Weindruch, R. (2009). *Toxicol Pathol* **37**, 47–51.
  21. Colman, R. J., Anderson, R. M., Johnson, S. C., *et al.* (2009). *Science* **325**, 201–204.
  22. Fontana, L., Kennedy, B. K., Longo, V. D., *et al.* (2014). *Nature* **511**, 405–407.
  23. Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S. D., *et al.* (2001). *Science* **292**, 288–290.
  24. Fontana, L., Partridge, L., and Longo, V. D. (2010). *Science* **328**, 321–326.
  25. Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006). *Cell* **124**, 471–484.
  26. Blagosklonny, M. V., and Hall, M. N. (2009). *Aging (Albany NY)* **1**, 357–362.
  27. Loewith, R., and Hall, M. N. (2011). *Genetics* **189**, 1177–1201.
  28. Powers, T., and Walter, P. (1999). *Mol. Biol. Cell* **10**, 987–1000.
  29. Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., *et al.* (2002). *Mol. Cell* **10**, 457–468.
  30. Cybulski, N., and Hall, M. N. (2009). *Trends Biochem. Sci.* **34**, 620–627.
  31. Urban, J., Soulard, A., Huber, A., *et al.* (2007). *Mol. Cell* **26**, 663–674.
  32. Fabrizio, P., Pletcher, S. D., Minois, N., *et al.* (2004). *FEBS Lett.* **557**, 136–142.
  33. Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., *et al.* (2008). *PLoS Genet.* **4**, e13.
  34. Cameroni, E., Hulo, N., Roosen, J., *et al.* (2004). *Cell Cycle* **3**, 462–468.
  35. Chatenay-Lapointe, M., and Shadel, G. S. (2011). *PLoS ONE* **6**, e20441.
  36. Ocampo, A., Liu, J., Schroeder, E. A., *et al.* (2012). *Cell Metab.* **16**, 55–67
  37. Pan, Y., Schroeder, E. A., Ocampo, A., Barrientos, A., and Shadel, G. S. (2011) Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive

- mitochondrial ROS signaling. *Cell Metab.* **13**, 668–678.
38. Bonawitz, N. D., Chatenay-Lapointe, M., Pan, Y., and Shadel, G. S. (2007). *Cell Metab.* **5**, 265–277.
  39. Pan, Y., and Shadel, G. S. (2009). *Aging (Albany NY)* **1**, 131–145.
  40. Hardwick, J. S., Kuruvilla, F. G., Tong, J. K., Shamji, (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14866–14870.
  41. Lavoie, H., and Whiteway, M. (2008). *Eukaryotic Cell* **7**, 1127–1135.
  42. Hess, D. C., Myers, C. L., Huttenhower, C., et al. (2009). *PLoS Genet.* **5**, e1000407.
  43. Fadok, V. A., de Cathelineau A, Daleke, D. L., et al. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 1071–1077.
  44. Liu, J., Dai, Q., Chen, J., et al. (2003). *Mol. Cancer Res.* **1**, 892–902.
  45. Tamura, Y., Sesaki, H., and Endo, T. (2014). *Traffic* **15**, 933–945.
  46. Margolin, A. A., Nemenman, I., Basso, K., et al. (2006). *BMC Bioinformatics* **7 Suppl 1**, S7.
  47. Hill, S., and Van Remmen, H. (2014). *Redox Biol* **2**, 936–944.

### Semblanza de la Dra. Soledad Funes Argüello



Soledad Funes es Bióloga y Doctora en Ciencias Biomédicas por la Universidad Nacional Autónoma de México. Por su trabajo de tesis doctoral recibió reconocimientos como la Medalla Alfonso Caso otorgada por la UNAM, y el premio Weizmann a la mejor tesis en Ciencias Naturales otorgado por la

Academia Mexicana de Ciencias y la Asociación de Amigos del Instituto Weizmann. Posteriormente realizó dos estancias postdoctorales en la Universidad de Múnich (Alemania).

Desde sus primeras experiencias en investigación se ha interesado en los procesos que rigen la biogénesis mitocondrial, primero estudiando el contenido génico y la estructura de genomas mitocondriales, más tarde analizando genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales, y los mecanismos que guían a esas proteínas a incorporarse en las mitocondrias de manera que sean funcionales. Recientemente fue reconocida con la Beca para las Mujeres en la Ciencia otorgada por L'Oréal, la UNESCO y la Academia Mexicana de Ciencias, y con el Estímulo a Investigaciones Médicas "Miguel Alemán Valdés" otorgado por la fundación Miguel Alemán A.C. Actualmente es Investigadora Titular en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y su principal interés de investigación sigue relacionado con la biogénesis mitocondrial y cómo es que estos organelos participan en el desarrollo celular.





Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 223-244, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## BIOGENESIS RIBOSOMAL Y RIBOSOMOPATÍAS

### RIBOSOME BIOGENESIS AND RIBOSOMOPATHIES

Alfonso Méndez-Godoy, Abril Gijbbers y Nuria Sánchez Puig

Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. México. [nuriasp@unam.mx](mailto:nuriasp@unam.mx)

#### RESUMEN

Los ribosomas son un complejo ribonucleoproteico esencial en la vida debido a que son los encargados de la síntesis de proteínas. El proceso mediante el cual se sintetizan los ribosomas se conoce como biogénesis ribosomal. Cambios en el entorno celular requiere que las células sean capaces de ajustar con rapidez y precisión la producción de ribosomas de acuerdo con la disponibilidad de recursos. La imposibilidad de responder a estos cambios adecuadamente repercute adversamente en la viabilidad celular, como comúnmente ocurre en cáncer y enfermedades genéticas. Deficiencias en la biogénesis y función ribosomal están involucrados en el desarrollo de enfermedades que se han denominado conjuntamente como ribosomopatías.

**Palabras clave:** Ribosomas, biogénesis ribosomal, ribosomopatías, Síndrome Shwachman-Diamond.

## ABSTRACT

Ribosomes are an essential ribonucleoprotein complex responsible of protein synthesis in the cell. The synthesis of ribosomes is known as ribosome biogenesis. To survive in a constantly changing environment the cell needs to adjust quickly and accurately the ribosomes production. The incapability to response to these alterations negatively impact the cell life, as commonly happens in cancer and genetic disease. Deficiencies in ribosome biogenesis and ribosome function are involved in a group of diseases called ribosomopathies.

**Keywords:** Ribosome biogénesis, Shwachman-Diamond Syndrome, Ribosomopathies, Biogénesis ribosomal

## INTRODUCCIÓN

### El ribosoma: características estructurales y funcionales

Los ribosomas son las máquinas moleculares encargadas de decodificar la información contenida en el genoma y sintetizar cada una de las proteínas requeridas para el crecimiento y mantenimiento celular. El ribosoma eucarionte está compuesto por una subunidad mayor (60S) y una subunidad menor (40S). Ambas subunidades difieren tanto en su estructura como en su función; la subunidad 40S se encarga de interpretar la información contenida en los ARN mensajeros (ARNm) y está formada por el ARN ribosomal (ARNr) 18S y 33 proteínas, mientras que la subunidad 60S cataliza la formación del enlace peptídico durante la síntesis de la proteína y está constituida por 47 proteínas (46 en levadura) y los ARNr 5S, 5.8S y 28S (25S en levadura) [1].

Biogénesis ribosomal: el origen de las ribosomopatías

Se conoce como biogénesis ribosomal al proceso molecular por el cual el ribosoma es construido. El ensamblaje ribosomal involucra la síntesis, procesamiento y modificación química de los cuatro ARNr, así como la producción y ensamblaje de las 80 proteínas estructurales. Para ello, la célula requiere de la actividad coordinada de las tres ARN polimerasas, cerca de 75 ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNP) y más de 200 proteínas accesorias o no ribosomales, éstas últimas están involucradas en la transcripción, exportación, modificación, ensamblaje y maduración de ambas subunidades ribosomales [2-4].

Debido a que la actividad de los ribosomas es fundamental, cualquier alteración que comprometa su correcto ensamblaje o función afecta la viabilidad

del organismo. A la fecha, se han descrito enfermedades que ocurren debido a mutaciones en genes que codifican para proteínas estructurales del ribosoma o biomoléculas accesorias de su biogénesis. En conjunto, a estas enfermedades se les conoce como ribosomopatías (tabla I) [5-8]. A continuación, se describe de manera general cómo ocurre el proceso de biogénesis ribosomal en eucariontes, particularmente en mamíferos, y se enfatiza sobre aquellos pasos que se muestran afectados en este grupo de enfermedades (Fig. 1).

### **Transcripción, procesamiento y modificación química del ARNr**

La biogénesis ribosomal comienza en un compartimiento especializado del núcleo conocido como nucléolo. La ARN polimerasa I transcribe un ARNr policistrónico conocido como pre-47S. Este ARNr sufre una serie de cortes endo- y exonucleolíticos para dar origen a los ARNr maduros 5.8S y 28S de la subunidad mayor, así como el 18S de la subunidad menor [9,10]. Por otro lado, el ARNr 5S es sintetizado por la ARN polimerasa III y procesado de manera independiente (Fig. 1) [11]. Mientras el ARNr es transcrito experimenta diferentes modificaciones químicas como la pseudouridinilación y metilación mediadas por snoRNPs [12]. En el ARNr humano se han descrito cerca de 100 sitios para cada tipo de modificación [13]. Estudios en *S. cerevisiae* han revelado que estas modificaciones están conservadas entre eucariontes y se presentan en secuencias relevantes para el funcionamiento ribosomal, ya que a pesar de que su ausencia no altera la arquitectura ribosomal normal, aquellos ribosomas que carecen de estas modificaciones muestran una reducción en su eficiencia de traducción [14-17]. Daños en componentes involucrados en la síntesis del ARNr están relacionados con el desarrollo del síndrome de Treacher Collins [18]. Mientras que fallas en el procesamiento y modificación química del RNAr están relacionados con la hipoplasia cartílago-cabello, la cirrosis infantil en niños indios norteamericanos, el síndrome de Bowen Conradi y la Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X [19-22] (Fig. 1).

### **Ensamblaje ribosomal: origen de las subunidades 40S y 60S**

Todos los ARNm que codifican para proteínas estructurales y no ribosomales son transcritos por la ARN polimerasa II y después traducidos en el citoplasma. Una vez sintetizadas, todas las proteínas son importadas al núcleo donde se asocian al ARNr mientras este es procesado y modificado químicamente. Se ha observado que durante el crecimiento celular, cerca del 60% de los ARNm corresponde a estas proteínas [10]; este alto porcentaje refleja la importancia que representa la síntesis de ribosomas para el funcionamiento de la célula. Una de las primeras partículas detectadas, precursoras de las subunidades 60S y 40S, es la partícula pre-90S. Esta partícula contiene principalmente

proteínas involucradas en la síntesis de la subunidad 40S y en conjunto son conocidas como el procesoma de la subunidad menor (SSU por sus siglas en inglés). La partícula 90S es procesada rápidamente para formar a la subunidad pre-40S, además de liberar al ARNr precursor de los ARNr 5.8S y 28S quienes se asocian inmediatamente a proteínas ribosomales y no ribosomales y al del complejo ribonucleoproteico que porta el ARNr 5S para formar a la partícula pre-60S [11,23] (Fig. 1). Ribosomopatías como la anemia de Blackfan-Diamond (ADB), el síndrome 5q<sup>-</sup> y la asplenia congénita (AC) tienen su origen en mutaciones sobre genes que codifican para proteínas estructurales (Tabla I).

### **Procesamiento y maduración de las partículas 40S y 60S**

Para completar el proceso de maduración, ambas subunidades son exportadas al citoplasma donde ocurre la síntesis de proteínas en eucariontes. La maduración de las subunidades ribosomales comprende el procesamiento final del ARNr y el ensamblaje de las últimas proteínas estructurales (L24 y L10). Una vez que las partículas pre-60S y pre-40S han llegado a este compartimento, se encuentran asociadas con proteínas no ribosomales cuya función es asistir su exportación y prevenir la interacción prematura entre ellas. Se ha propuesto que la unión o remoción de estas proteínas accesorias es un mecanismo de control de calidad que permite comprobar la funcionalidad y ensamblaje adecuado de la partícula ribosomal traduccionalmente competente [24-26]. En el caso particular de la subunidad 60S, uno de los pasos más importantes implica la liberación de la proteína eIF6; esta proteína es considerada un factor de anti-asociación que evita el ensamblaje prematuro entre las dos subunidades, por tanto, su liberación es esencial para la formación de la partícula 80S. Este evento es catalizado por la participación conjunta de la GTPasa Efl1, también conocida como EFTUD1 en humanos, y el factor intercambiador de nucleótidos SBDS [27-29]. La Efl1, es una proteína homóloga al factor de elongación 2 (EF-2) y debido a que ésta última se encarga de dirigir la translocación del ARNt desde el sitio A al sitio P durante la síntesis proteica, se ha propuesto que Efl1 realiza un papel similar para comprobar que la subunidad mayor se ha ensamblado correctamente, y así, promover la formación del ribosoma traduccionalmente competente [30]. El síndrome Shwachman-Diamond es una ribosomopatía que tiene como origen defectos en la proteína accesoria SBDS (tabla I).

Tabla I. Lista de algunas ribosomopatías y sus principales características.

Enfermedad	Manifestaciones clínicas	Gen(es) mutado	Función en la biogénesis ribosomal	Posible mecanismo
Autosómica dominante				
Anemia de Blackfan-Diamond	Anemia, falla medular, defectos cardiacos, anomalías óseas, predisposición a desarrollar cáncer	RPS7, RPS10, RPS17, RPS19, RPS24, RPS26, RPL5, RPL11, RPL26, RPL35A	Proteína estructural del ribosoma	Traducción de los ARNm que contienen IRES BAG1 y CSDE1
Síndrome de Treacher-Collins	Retraso psicomotor y mental, anomalías craneofaciales, microcefalia	TCOF1	Transcripción de los ARNr	Expresión abundante de la proteína Treacle en células de la cresta neural.
Asplenia congénita	Desarrollo pobre del vaso	RPSA	Proteína estructural del ribosoma	Desconocido
Autosómica recesiva				
Síndrome de Shwachman-Diamond	Insuficiencia pancreática exocrina, anomalías esqueléticas, falla medular, predisposición a desarrollar cáncer, neutropenia	SBDS	Remoción de eIF6 de la subunidad 60S para formar el ribosoma maduro	Expresión abundante de la proteína en páncreas
Síndrome de Bowen-Conradi	Retraso severo en el crecimiento pre- y post-natal, microcefalia, mandíbula pequeña, retraso psicomotor	EMG1	Metilación específica de una pseudouridina en el ARNr 18S	Desconocido
Hipoplasia cartílago-cabello	Baja estatura, cabello escaso, alteraciones inmunológicas y hematológicas, predisposición a desarrollar cáncer	RMRP	Procesamiento del pre-ARNr	Procesamiento defectuoso del ARNm de la ciclina B
Cirrosis infantil en niños indios norteamericanos	Ictericia neonatal con progresión a cirrosis biliar	CIRH1A	Procesamiento del pre-ARNr	Expresión abundante de la proteína Cirh1 en hígado
Recesiva ligada al cromosoma X				
Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X	Pigmentación anormal de la piel, distrofia en uñas, falla medular, baja estatura, leucoplaquia, predisposición a desarrollar cáncer	DKC1	Pseudouridin-sintasa	Traducción de ARNm que contienen IRES entre los que se encuentran p27 y Bcl-xL
Esporádica				
Síndrome 5q <sup>-</sup>	Anemia macrocítica, predisposición a desarrollar leucemia mieloide aguda	RPS14	Proteína estructural del ribosomal	Desconocido

Sorpresivamente, a pesar de que el desarrollo de cada una de las ribosomopatías está involucrado con defectos en el proceso de ensamblaje ribosomal, cada una de estas enfermedades difiere significativamente en su mecanismo, cuadro clínico (inclusive, se han observado diferencias clínicas en pacientes diagnosticados con el mismo síndrome) y tratamiento potencial. En seguida se describe detalladamente cada una las ribosomopatías enunciadas anteriormente.

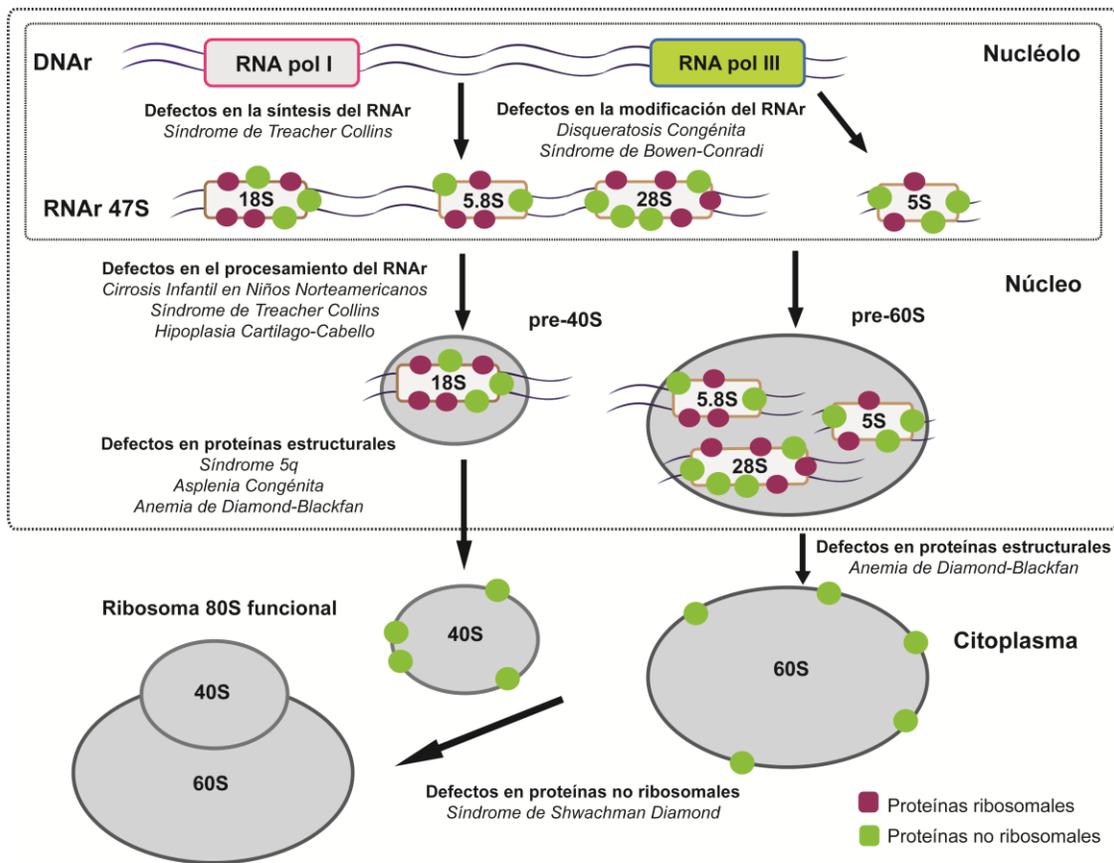


Figura 1. Esquema simplificado de la biogénesis ribosomal en eucariontes donde se muestran las diferentes etapas en donde participan biomoléculas implicadas en el desarrollo de enfermedades.

### Ribosomopatías

#### Enfermedades relacionadas con el procesoma SSU (Small SubUnit processome)

En células eucariontes, el procesamiento y ensamblaje de la subunidad ribosomal menor, así como la maduración del rARN 18S, requiere de la ribonucleoproteína denominada procesoma SSU. El procesoma SSU es un

complejo casi tan grande como el ribosoma mismo que se ensambla de forma co-transcripcional con el pre-ARNr 47S en el nucléolo y contiene al snoARN U3 y más de 40 proteínas entre las que se incluyen denominadas proteínas U tres (UTPs) [31]. Las proteínas del procesoma se pueden ensamblar de forma independiente en sub-complejos, uno de ellos es el sub-complejo t-UTP conformado por Utp4, Utp5, Utp8, Utp9, Utp10, Utp15 y Utp17. Mutaciones en componentes del procesoma SSU se han asociado con el desarrollo con ribosomopatías como las que se describen a continuación, además de problemas de infertilidad y cáncer de ovario, y posiblemente con el síndrome de Willis-Beuren [32].

### **Cirrosis infantil en niños indios norteamericanos (NAIC)**

La cirrosis del niño indio norteamericano o NAIC por sus siglas en inglés (North American Indian Childhood Cirrosis) (OMIM: 604901) es una rara enfermedad autosómica recesiva encontrada exclusivamente en niños de la población aborigen Ojibway-Cree en Canadá. La incidencia de esta enfermedad es de 1:750 en niños Ojibway-Cree y se presenta como ictericia neonatal que progresa a cirrosis biliar e hipertensión en la vena porta [33] cuyo único tratamiento es el trasplante de hígado. El gen mutado en este padecimiento corresponde a *CIRH1A* que codifica para la proteína UTP4/Cirhin con la mutación R565W. UTP4/Cirhin es parte del procesoma SSU y a su vez es miembro del sub-complejo t-UTP/UTPA requerido para el procesamiento del pre-18S ARNr, pero no para su transcripción. Estudios con el ortólogo de levadura demostraron que la región C-terminal de la proteína donde reside esta mutación, es necesaria para la interacción con Utp8. Sin embargo, la mutación no interrumpe la interacción proteína-proteína tan sólo la debilita, por lo que no es claro si los defectos en el procesamiento del pre-ARNr son resultado de la pérdida en la interacción entre estas proteínas constituyendo la base de esta enfermedad [34]. Estudios en embriones de ratón y pez cebra han demostrado que la proteína UTP4/Cirhin se encuentra altamente expresada en el hígado durante las primeras etapas del desarrollo mientras que su expresión en otros tejidos es relativamente baja [35,36]. Lo anterior sugiere que la alta demanda de Cirhin en hígado hace a este órgano más susceptible a la pérdida de su función.

### **Síndrome de Bowen-Conradi (BCS)**

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1976 como un padecimiento fatal que afectaba a la comunidad Huterita de las praderas Norteamericanas. La enfermedad se presenta como en un retraso generalizado en el desarrollo, pobre reflejo de succión, y malformaciones óseas principalmente en nariz, quijada y cráneo dollicéfalo (mayor altura en relación con el ancho del

cráneo). El gen mutado en esta enfermedad se encuentra conservado desde arquea hasta eucariontes y se conoce como *EMG1* que corresponde al acrónimo de “esencial para el crecimiento mitótico 1”. La mutación *EMG1* D86G presente en los pacientes con el síndrome de Bowen-Conradi resulta en una disminución de los niveles de proteína, sin alterar la transcripción de su ARNm, e impide la acumulación nucleolar de esta proteína [19,37]. La proteína *EMG1* codifica para una N1 pseudouridin-metil-transferasa dimérica que cataliza la metilación de la pseudouridina 1248 en el ARNr 18S humano. De manera interesante, la mutación anterior no altera su actividad de metiltransferasa, pero favorece la formación del dímero, lo que se cree altera su distribución celular [37]. El ortólogo de levadura (*Nep1*) es una proteína esencial nucleolar y miembro del procesoma SSU la cual es necesaria para la maduración del pre-18S ARNr y la biogénesis ribosomal. Los defectos en el crecimiento observado en células carentes de esta proteína pueden ser rescatados por la sobreexpresión de *Rps19* y *Nop6* [38]; dos proteínas de la biogénesis ribosomal. Además, la proteína *Rps19* se encuentra mutada en 25% de pacientes con otra ribosomopatía conocida como Anemia de Blackfan-Diamond (ver descripción más abajo).

### **Enfermedades relacionadas con biomoléculas accesorias de la biogénesis ribosomal**

El síndrome Shwachman-Diamond (SDS, OMIM 260400) es una enfermedad autosómica recesiva [39] que se caracteriza por insuficiencia pancreática exocrina, disfunción de la médula ósea y anomalías esqueléticas. El SDS es también conocido como “Síndrome Shwachman”, “Síndrome Shwachman-Bodian”, “Síndrome Shwachman-Bodian-Diamond” y “lipomatosis congénita del páncreas”.

### **Características clínicas de la enfermedad**

En 1964 Harry Shwachman, Louis Diamond y Martin Bodian describieron por primera vez la presencia de neutropenia y disfunción pancreática en niños, descartando fibrosis quística por ausencia de dificultades respiratorias y concentraciones normales de electrolitos en sudor. A partir de estas observaciones se concluyó la presencia de una condición antes desconocida. El SDS es un síndrome multisistémico con fenotipo variable y se estima que la incidencia es aproximadamente 1:168,000 nacimientos vivos [40].

### **Anormalidades pancreáticas exocrinas**

A pesar de ser una enfermedad poco común, SDS es considerada la causa más común de insuficiencia pancreática en niños junto con la fibrosis quística. Análisis histológicos del páncreas de pacientes revelan que el sistema exocrino se ve afectado por un elevado reemplazo graso en el tejido acinar, no obstante de que se observa una estructura normal del conducto [41]. El 86% de los pacientes tienen mala absorción y esteatorrea generando malnutrición y deficiencia de vitaminas liposolubles (A, D, E y K) [42]. Las manifestaciones más severas ocurren en la infancia. Sin embargo, conforme pasan los años más del 50% de los pacientes mejoran la producción enzimática y generan suficiencia pancreática con absorción normal de grasas [41].

### **Anormalidades del sistema hematopoyético**

El SDS es el tercer síndrome más común de disfunción medular después de la anemia de Fanconi y la anemia Blackfan-Diamond. Uno de los requisitos para el diagnóstico de SDS es la neutropenia en los niños, ésta es la anomalía más común con una incidencia entre 88-100% en los pacientes [43]. Los niveles de neutrófilos en SDS fluctúa de niveles muy bajos a normales presentando una neutropenia intermitente sin un ciclo hematopoyético [44]. Los neutrófilos son el primer tipo celular que responde a una infección y, por ende, los pacientes con SDS son susceptibles a infecciones bacterianas, virales o micóticas. Complicaciones con una sepsis es la causa más común de muerte en los primeros años de vida de un paciente con SDS. Esta susceptibilidad existe por el bajo número de células y una deficiencia en la movilidad y migración en las existentes [45]. Sin embargo, no es la única barrera inmunológica afectada, los estudios muestran también bajos niveles de linfocitos B y T [45]. Niveles bajos de reticulocitos y de plaquetas también es común, pero si se presenta hipoplasia de las tres líneas celulares (pancitopenia) y hay un mal pronóstico por una elevada probabilidad de desarrollar síndrome mielodisplásico (de sus siglas en inglés, MDS) o leucemia [43]. La leucemia o cáncer de la sangre es una enfermedad que afecta a la médula ósea. El Instituto Nacional de Cáncer de EUA tiene un estimado de 52,380 nuevos casos de leucemia en el 2014 y 24,090 muertes. Con esta incidencia la leucemia se considera un cáncer relativamente raro (11<sup>o</sup> lugar), sin embargo, la tasa de muerte lo pone entre los cinco cánceres más peligrosos (el 42.8 % de las pacientes morirán en 4 años o menos). En los últimos 20 años, los avances en la ciencia no han logrado disminuir el número de muertes debido a la complejidad y variedad de la enfermedad, por lo que SDS juega un papel muy importante en el entendimiento del desarrollo de este cáncer.

### **Anormalidades esqueléticas y otros órganos**

El sistema óseo es el más afectado después del pancreático y hematopoyético en pacientes con SDS. Las anomalías en este sistema son muy variadas, sin embargo, más de la mitad de los pacientes tienen disostosis metafisal, generalmente de la cabeza femoral. Otros órganos o estructuras afectadas son el hígado, cerebro, riñones, ojos, piel, testículos, corazón, sistema pancreático endocrino y nervioso, y la estructura craneofacial [42,44].

### **SBDS**

El síndrome Shwachman-Bodian-Diamond se debe a mutaciones en el gen *SBDS* [46]. Este gen se compone de cinco exones con una longitud de 7.9kb y un transcrito de 1.6kb que codifica para una proteína de 250 aminoácidos [47]. Sólo el 90% de los pacientes contienen al gen *SBDS* mutado en uno o ambos alelos alterando la función del producto, del 10% restante se desconoce la molécula afectada. La mayoría de los pacientes (75%) presentan mutaciones ocasionadas por la conversión con un pseudogen (*SBDSP*) adyacente con 97% de identidad y que predice la síntesis de una proteína truncada [47]. Estas mutaciones son la 183-184TA→CT, que genera un codón de paro en el aminoácido 62 (K62X), y la 258+2T→C que interrumpe el sitio donador del empalme en el intrón 2 generando otro en el sitio 251-252 (Fig. 2). Este cambio en el sitio de empalme produce un corrimiento en el marco de lectura que codifica para una proteína truncada en el aminoácido 84 (C84fsX3) [47]. Los cambios en *SBDS* se presentan en variadas combinaciones. El 60% de los pacientes presentan mutaciones en ambos alelos y generalmente uno de ellos es a causa de la conversión con *SBDSP*, incluso se han detectado más de una mutación en el mismo alelo. La mayor parte de estos pacientes son heterocigotos, sin embargo, se han presentado pacientes homocigotos con la mutación del sitio de empalme, lo interesante es que no existen homocigotos con la mutación K62X presumiblemente letal. Hasta ese punto se desconocía la función del gen pero era claro que este síndrome debía tener más factores involucrados, ya que pacientes con las mismas mutaciones no presentan el mismo fenotipo [48].

En condiciones normales, el gen *SBDS* codifica para una proteína de 250 aminoácidos conocida por el mismo nombre y que se expresa en todos los tejidos del cuerpo humano [47]. Ésta proteína forma parte de una familia altamente conservada en el dominio *Archaea* y *Eucarya*, pero no en *Bacteria* [49]. Las estructuras cristalinas de ortólogos de *SBDS* de *Archaeoglobus fulgidus* [29,50] y *Methanothermobacter thermautotrophicus* [51], así como la estructura de la

proteína humana obtenida por RMN [27] muestran una estructura tridimensional muy similar entre ellas a pesar de la poca identidad (22%) [27]. Está formada por tres dominios: un dominio N-terminal con un plegamiento denominado FYSH (por su homología con un dominio de la proteína de levadura Yhr087wp; Fungal, Yhr087wp, Shwachman), el cual parece contribuir al plegamiento y estabilidad de la proteína; un dominio central que confiere especie-especificidad a la proteína; y el C-terminal con una estructura del tipo ferredoxina con homología estructural al dominio V del factor de elongación 2 de levadura, dominio de unión a ARN (Fig. 2) [29,49,50].

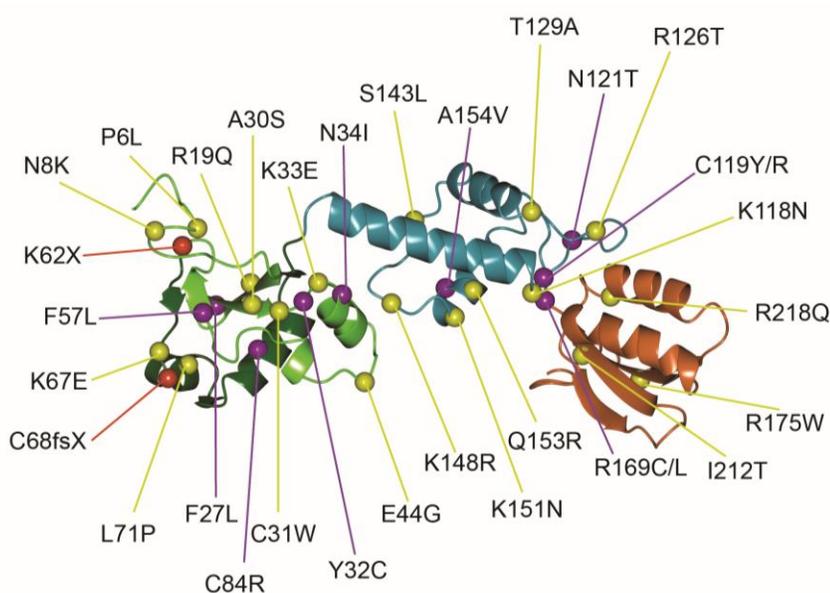


Figura 2. Estructura cristalográfica de la proteína humana SBDS (27). Distribución en el espacio de los tres dominios (I: verde; II: azul, y III: naranja). Mutaciones presentes en pacientes con SDS que afectan la superficie de la proteína se resaltan con esferas de color amarillo, mientras que las que afectan la estabilidad de la proteína son color morado. Esferas rojas representan residuos donde es truncada la proteína por mutaciones. En verde claro se resalta los residuos sintetizados cuando se presenta la mutación K62X (PDB 2L9N).

SBDS es un gen esencial, modelos en ratones [52] y levadura [53] muestran la pérdida de viabilidad al eliminar el gen. La proteína SBDS se localiza tanto en citoplasma como en núcleo, con altas concentraciones en el nucléolo [54]. Este sitio tiene como función primordial la biogénesis ribosomal. Evidencias por estudios en ortólogos de SBDS sugerían su participación en la biogénesis ribosomal. En Archaea, el gen se encuentra en un operón que contiene genes procesadores de ARN [55]. Diversos ensayos en *Saccharomyces cerevisiae*

relacionan a Sdo1, ortólogo de SBDS, en el procesamiento de ARN y biogénesis ribosomal [6,50]. Menne et al. [53] demostraron su participación en la maduración de la subunidad 60S al liberar al factor anti-asociación Tif6, proponiendo como modelo que Sdo1 se une al ribosoma y recluta a la GTPasa EFL1 para liberar a Tif6 mediante un re-arreglo conformacional promovido por la energía de hidrólisis del GTP. En el instituto de Química de la UNAM, nuestro laboratorio se dedica al estudio de este modelo *in vitro*, donde demostramos que tanto la proteína SBDS de levadura como la humana disminuyen a la mitad la constante de Michaelis-Menten de EFL1 por GTP [28] debido a un aumento en la constante de disociación por GDP (datos no publicados) (Fig. 3). De tal modo que SBDS es una proteína efectora de EFL1 que actúa como su intercambiador de nucleótidos de guanina. La relación normal intracelular de GDP/GTP es 1:10 [56], por lo que la proteína EFL1 libre se encuentra preferentemente en un estado inactivo unido a GDP con una relación de 2:1 con respecto al estado activo unido a GTP. Esta situación cambia cuando EFL1 se encuentra en complejo con SBDS donde la relación se convierte en 1:50 y por tanto EFL1 se encuentra en su forma activa. Entre las mutaciones que presentan pacientes con SDS se puede hacer una clasificación según el efecto que tengan sobre la proteína: 1) mutaciones que truncan a la proteína, 2) mutaciones puntuales que desestabilizan a la proteína causando su desnaturalización y 3) mutaciones puntuales que afectan epítomos en la superficie de la proteína (Fig. 2) [27]. Recientemente demostramos que residuos pertenecientes a este último grupo de mutaciones participan directamente en la interacción con EFL1 y causan la pérdida de interacción entre ellas (Fig. 3).

La biogénesis ribosomal es una vía esencial para la célula pero no explica todas las características clínicas que presentan los pacientes con el síndrome Shwachman-Diamond. Otros estudios han relacionado a la proteína SBDS con múltiples vías además de la biogénesis ribosomal, tales como motilidad celular [57], regulación de especies reactivas de oxígeno [58], estabilizando el huso mitótico [59,60] y función mitocondrial [61].

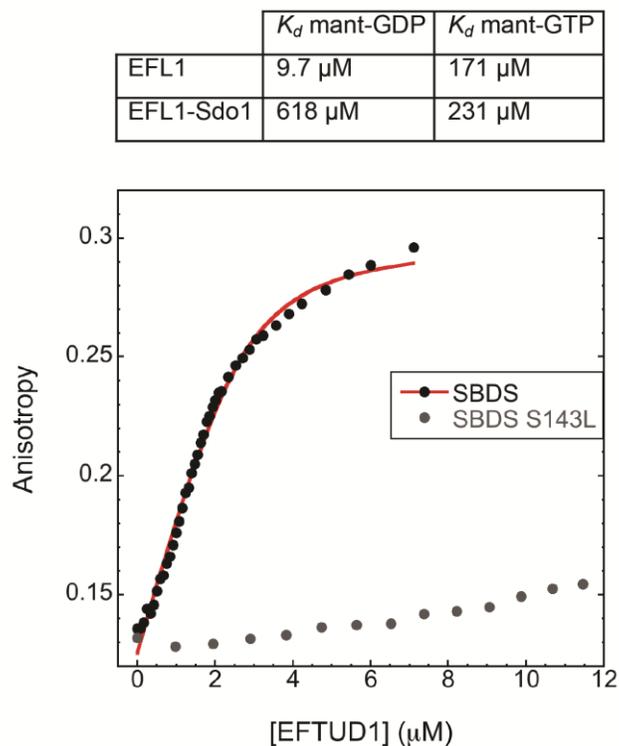


Figura 3. Tabla con los valores de constantes de disociación de la GTPasa EFL1 por nucleótidos en presencia y ausencia de Sdo1. Curva de unión de EFL1 y SBDS, y pérdida de unión por mutación S143L.

### Disqueratosis congénita ligada al cromosoma X

Esta enfermedad se caracteriza por una pigmentación anormal de la piel, distrofia en las uñas y leucoplaquia. La disqueratosis congénita, además de la versión ligada al cromosoma X (OMIM 305000), también se presenta en forma autosómica dominante (OMIM 127550, 613989, 613990) y autosómica recesiva (OMIM 224230, 613988). Sin embargo, la disqueratosis ligada al cromosoma X es la que ha sido mejor documentada como una enfermedad asociada con fallas en la síntesis de ribosomas. Los pacientes presentan mutaciones en el gen *DKC1* que codifica para una proteína denominada disquerina; un componente de los snoRNPs tipo caja H/ACA encargado de la isomerización de uridina a pseudouridina [21,62]. Disquerina también forma parte de la telomerasa, y defectos tanto en la biogénesis ribosomal como en el mantenimiento de los telómeros se han observado tanto en pacientes como en ratones modelo de la enfermedad [63,64], sin que se conozca aún la contribución de cada proceso en el desarrollo de la enfermedad. En pacientes con disqueratosis congénita, se ha

observado que alteraciones en la pseudouridinilación del ARNr modifican la afinidad del ribosoma por diferentes ARNm, en especial, una reducción en la traducción de ARN mensajeros que depende de sitios de entrada interna del ribosoma (IRES) [65]. Entre los ARNm cuyos niveles de traducción se encuentran disminuidos están los correspondientes al supresor de tumores p27, y las proteínas anti-apoptóticas XIAP y Bcl-xL. Adicionalmente, las mutaciones en disquerina afectan la proliferación celular debido a la acumulación de células fase G2/M del ciclo celular [66]. Lo anterior se puede deber a que la traducción de CDK<sup>p58</sup>, una proteína involucrada en la progresión a la fase M del ciclo celular, es mediada por IRES. Esto demuestra que no sólo la modificación de ARNr es importante para la especificidad de los ribosomas, sino que también es importante para la traducción de ARNm a través de IRES bajo ciertas condiciones y tejidos celulares.

### **Síndrome de Treacher Collins**

El síndrome de Treacher-Collins es una afección del desarrollo craneofacial de transmisión autosómica dominante. Mutaciones en los genes *TCOF1*, *POLR1C* y *POLR1D* originan esta enfermedad; siendo las mutaciones en *TCOF1* las que constituyen la mayoría de los casos clínicos [18]. El gen *TCOF1* codifica para una proteína denominada Treacle mientras que los otros dos genes codifican para subunidades de la ARN polimerasa I y ARN polimerasa III, respectivamente. La función exacta de Treacle no se conoce aún, sin embargo, Treacle interacciona con el factor de unión río-arriba (UBF, upstream binding factor) y modula la actividad de la ARN polimerasa I inhibiendo la transcripción de los ARNr [67]. Además, Treacle interacciona con fibrilarina, una ADN y ARN metiltransferasa, y con NOP56 un componente del complejo RNP metiltransferasa. En modelos de ratón y pez cebra de esta enfermedad se ha encontrado una baja tasa de proliferación y alta apoptosis en células de la neuro crestal [68], por lo que se cree que la reducción en la transcripción de ARNr y su modificación por haploinsuficiencia de Treacle es la causa de los defectos en la proliferación de las células de la cresta neural que resulta en defectos en los huesos faciales.

### **Hipoplasia cartílago cabello (CHH)**

Es un padecimiento observado principalmente en la comunidad Amish y finlandesa (OMIM #250250). Clínicamente se caracteriza por baja estatura debido al acortamiento de los miembros inferiores, manos y dedos, cabellos finos y escasos, deformaciones óseas en cráneo y defectos hematológicos e inmunológicos [69]. Es una enfermedad hereditaria de transmisión autosómica recesiva. Su prevalencia entre los Amish se explica por constituir un grupo aislado

y cerrado y la gran consanguinidad entre sus miembros. La displasia anauxética (AD) es un padecimiento relacionado con CHH en el que los defectos esqueléticos son más severos y los pacientes presentan menor estatura (85 cm en adultos) sin mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer. Ambos padecimientos resultan de mutaciones en el ARN catalítico de la RNAsa RMP (donde RMP significa del inglés RNA mitochondrial processing) [22]. La RNAsa RMP es una ribonucleoproteína encargada de la degradación de los ARN mensajeros y el procesamiento del ARNr. En particular, se encarga de cortar el precursor del ARNr en el sitio A3 produciendo la forma larga y corta del ARNr 5.8 S. En la hipoplasia cartílago cabello las mutaciones se encuentran tanto en el promotor como en la región transcrita del gen *RMRP*. La mutación más frecuente es la mutación puntual 70A→G mientras que en la displasia anauxética corresponde a la inserción 111\_112insACGTAGACATTCCT. Una lista detallada de las mutaciones ocurrientes en el ARN de la RNAsa RMP se pueden encontrar en Martin *et. al.* [70]. La baja estatura en CHH y AD se han atribuido al procesamiento deficiente del ARNr 5.8S que resulta en una baja proliferación de los condrocitos (células de cartílago). Mientras que la predisposición a desarrollar cáncer en pacientes con CHH parece deberse a que el ARNm de la ciclina B no es degradado por la RNAsa RMP y la acumulación de esta proteína altera el control en el ensamblaje del huso mitótico.

### **Enfermedades relacionadas con proteínas estructurales del ribosoma**

La anemia de Blackfan-Diamond (DBA) (OMIM 205900) se caracteriza por una anemia macrocítica (eritrocitos de gran tamaño) con un bajo número de progenitores eritroides en la médula ósea, además de defectos esqueléticos en el cráneo, nariz, pulgar y baja estatura. Los pacientes tienen una alta predisposición a desarrollar leucemia mieloide aguda (AML) y sarcoma osteogénico. Actualmente el único tratamiento efectivo para curar la anemia es el trasplante de células madre eritropoyéticas [71]. Es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en genes que conforman a la subunidad ribosomal mayor y menor. Aproximadamente el 50% de los pacientes son heterocigotos con mutaciones en un alelo de los genes que codifican para las proteínas ribosomales S26, S19, L5 ó L11, mientras que mutaciones en las proteínas S7, S24, S17, S10, ó L35a representan un porcentaje menor de los casos de esta enfermedad [72]. Sin embargo, existe un 30% de pacientes diagnosticados con esta enfermedad que no presentan mutaciones en los genes anteriores y por tanto nuevos candidatos deben ser identificados. A pesar de que todos los pacientes presentan anemia no se ha podido establecer una correlación entre la mutación presente y la afección particular, tan sólo se han asociado mutaciones en L11 y L5 con anomalías en

el pulgar y en el paladar [73]. Por lo que cada proteína ribosomal debe de tener papeles específicos que resultan en los distintos fenotipos observados en DBA, ya sea a través de su función en la biogénesis ribosomal o funciones extra-ribosomales. Estudios en células de pacientes evidenciaron que mutaciones en *Rps19* y *RPL11* resultan en la deficiente traducción de los ARNm dependientes de IRES de las proteínas BAG1 y CSDE1 que están implicadas en la diferenciación de progenitores hematopoyéticos a eritroblastos [74]. Más aún, los niveles de expresión de estas proteínas son bajos en células progenitoras mieloides pero alto en progenitores eritroides. Sin embargo, aún es necesario establecer si la traducción de ARNm dependientes de IRES además de BAG1 y CSDE1 son relevantes para en el fenotipo observado en pacientes con DBA.

### **Síndrome 5q -**

Esta enfermedad comparte varios de los síntomas clínicos y características patológicas de DBA; como son la anemia macrocítica y un bajo número de eritrocitos en médula ósea. Además, los pacientes tienen un número elevado de plaquetas, un número bajo de neutrófilos y megacariocitos hipolobulados. Es considerado un subtipo de síndrome mielodisplásico y ocurre por la delección *de novo* heterocigota en una región entre las bandas q21 y q32 del cromosoma 5 [75]. La enfermedad ocurre por haploinsuficiencia de múltiples genes entre ellos *RPS14* [76] y algunos otros que incluyen al supresor de tumores *SPARC* y los microARNs miR-145 y miR-146a cuya delección contribuye a la megacariopoesis aberrante [77]. El silenciamiento de *RPS14* mediante ARN de interferencia en células madre hematopoyéticas replica el comportamiento observado en pacientes con 5q- que además resulta en la acumulación de p53 en células progenitoras eritroides. A su vez, la inducción de p53 ocasiona la acumulación de p21 y el consecuente arresto celular en este linaje lo que podría explicar la deficiente eritropoyesis en esta enfermedad [78].

### **Asplenia congénita**

La asplenia congénita es una enfermedad hereditaria autosómica dominante causada por mutaciones en el gen *RPSA* que codifica para la proteína estructural de la subunidad ribosomal pequeña SA [79]. Se caracteriza por la ausencia de bazo al nacer sin que se presenten otros defectos del desarrollo y los pacientes mueren en los primeros años de vida debido a infecciones bacterianas. Hasta ahora el ribosoma se ha visto como una máquina molecular cuya función exclusiva es la síntesis de proteínas de forma automatizada sin participar en la regulación de los procesos biológicos. Contrario a esta creencia, las proteínas

ribosomales, independientemente de su función como proteínas estructurales o accesorias, juegan un papel muy complejo dentro de las células. Es claro que dependiendo el ámbito celular, los ribosomas traducen de forma preferencial distintos tipos de ARNm. Esto a su vez, puede impactar en diferentes aspectos de la biogénesis ribosomal y explicar cómo es que alteraciones en el proceso produce enfermedades con fenotipos particulares. Estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la biogénesis ribosomal es muy importante para comprender tanto las bases moleculares de las distintas ribosomopatías como para entender un proceso biológico fundamental como lo es la síntesis de ribosomas.

### Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el CONACyT proyectos 166472 and 167359 para la realización de algunos de los experimentos presentados en este documento.

### Referencias

1. Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, et al. (2012). *Nature structural & molecular biology* **19**, 560-567.
2. Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). *Gene* **313**, 17-42.
3. Panse, V. G., and Johnson, A. W. (2010). *Trends in biochemical sciences* **35**, 260-266.
4. Woolford, J. L., Jr., and Baserga, S. J. (2013). *Genetics* **195**, 643-681.
5. Armistead, J., and Triggs-Raine, B. (2014). *FEBS letters* **588**, 1491-1500.
6. Ganapathi, K. A., Austin, K. M., Lee, C. S., et al.. (2007). *Blood* **110**, 1458-1465.
7. McCann, K. L., and Baserga, S. J. (2013). *Science* **341**, 849-850.
8. Nakhoul, H., Ke, J., Zhou, X., Liao, W., et al. (2014). *Clinical medicine insights. Blood disorders* **7**, 7-16.
9. Granneman, S., and Baserga, S. J. (2004). *Experimental cell research* **296**, 43-50.
10. Warner, J. R. (1999). *Trends in biochemical sciences* **24**, 437-440.
11. Ciganda, M., and Williams, N. (2011) Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 523-533.
12. Kiss, T. (2001). *The EMBO journal* **20**, 3617-3622.
13. Maden, B. E. (1990). *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **39**, 241-303.
14. Baxter-Roshek, J. L., Petrov, A. N., and Dinman, J. D. (2007). *PloS one* **2**, e174.
15. Decatur, W. A., and Fournier, M. J. (2002). *Trends in biochemical sciences* **27**, 344-351.
16. Jack, K., Bellodi, C., Landry, D. M., et al. (2011). *Molecular cell* **44**, 660-666.
17. Liang, X. H., Liu, Q., and Fournier, M. J. (2007). *Molecular cell* **28**, 965-977.

18. Dauwerse, J. G., Dixon, J., Seland, S., et al. (2011). *Nature genetics* **43**, 20-22.
19. Armistead, J., Khatkar, S., Meyer, B., et al. (2009). *American journal of human genetics* **84**, 728-739.
20. Freed, E. F., Prieto, J. L., McCann, et al. (2012). *PLoS genetics* **8**, e1002892.
21. Lafontaine, D. L., Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., et al. (1998). *Genes & development* **12**, 527-537.
22. Ridanpaa, M., van Eenennaam, H., Pelin, K., et al. (2001). *Cell* **104**, 195-203.
23. O'Donohue, M. F., Choemsel, V., Faublader, M., et al. (2010). *The Journal of cell biology* **190**, 853-866.
24. Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J. (2010). *Biochimica et biophysica acta* **1803**, 673-683.
25. Lo, K. Y., Li, Z., Bussiere, C., et al. (2010). *Molecular cell* **39**, 196-208.
26. Karbstein, K. (2013). *Trends in cell biology* **23**, 242-250
27. Finch, A. J., Hilcenko, C., Basse, N., et al. (2011). *Genes & development* **25**, 917-929.
28. Gijsbers, A., Garcia-Marquez, A., Luviano, A., and Sanchez-Puig, N. (2013). *Biochemical and biophysical research communications* **437**, 349-354.
29. Shammas, C., Menne, T. F., Hilcenko, C., et al. (2005). *The Journal of biological chemistry* **280**, 19221-19229
30. Bussiere, C., Hashem, Y., Arora, S., et al. (2012). *The Journal of cell biology* **197**, 747-759.
31. Phipps, K. R., Charette, J. M., and Baserga, S. J. (2012). *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 1-21.
32. Sondalle, S. B., and Baserga, S. J. (2014). *Biochimica et biophysica acta* **1842**, 758-764.
33. Richter, A., Mitchell, G. A., and Rasquin, A. (2007). *Medecine sciences : M/S* **23**, 1002-1007.
34. Freed, E. F., and Baserga, S. J. (2010). *Nucleic acids research* **38**, 4798-4806
35. Drouin, E., Russo, P., Tuchweber, B., et al. (2000). *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **31**, 395-404.
36. Wilkins, B. J., Lorent, K., Matthews, R. P., and Pack, M. (2013). *PloS one* **8**, e77670.
37. Meyer, B., Wurm, J. P., Kotter, P., et al. (2011). *Nucleic acids research* **39**, 1526-1537.
38. Buchhaupt, M., Meyer, B., Kotter, P., and Entian, K. D. (2006). *Molecular genetics and genomics : MGG* **276**, 273-284.
39. Ginzberg, H., Shin, J., Ellis, L., et al. (2000). *American journal of human genetics* **66**, 1413-1416.
40. Minelli, A., Nicolis, E., Cannioto, Z., et al. (2012). *Pediatric blood & cancer* **59**, 1334-1335.

41. Dror, Y., Durie, P., Ginzberg, H., et al. (2002). *Experimental hematology* **30**, 659-669.
42. Ginzberg, H., Shin, J., Ellis, L., et al. (1999). *The Journal of pediatrics* **135**, 81-88.
43. Dror, Y., and Freedman, M. H. (2002). *British journal of haematology* **118**, 701-713.
44. Aggett, P. J., Cavanagh, N. P., Matthew, D. J., et al. (1980). *Archives of disease in childhood* **55**, 331-347.
45. Dror, Y., Ginzberg, H., Dalal, I., et al. (2001). *British journal of haematology* **114**, 712-717.
46. Goobie, S., Popovic, M., Morrison, J., et al. (2001). *American journal of human genetics* **68**, 1048-1054.
47. Boocock, G. R., Morrison, J. A., Popovic, M., et al. (2003). *Nature genetics* **33**, 97-101.
48. Kuijpers, T. W., Alders, M., Tool, A. T., et al. (2005). *Blood* **106**, 356-361.
49. Boocock, G. R., Marit, M. R., and Rommens, J. M. (2006). *Genomics* **87**, 758-771.
50. Savchenko, A., Krogan, N., Cort, J. R., et al. (2005). *The Journal of biological chemistry* **280**, 19213-19220.
51. Ng, C. L., Waterman, D. G., Koonin, E. V., et al. (2009). *BMC structural biology* **9**, 32.
52. Zhang, S., Shi, M., Hui, C. C., and Rommens, J. M. (2006). *Molecular and cellular biology* **26**, 6656-6663.
53. Menne, T. F., Goyenechea, B., Sanchez-Puig, N., et al. (2007). *Nature genetics* **39**, 486-495.
54. Austin, K. M., Leary, R. J., and Shimamura, A. (2005). *Blood* **106**, 1253-1258.
55. Koonin, E. V., Wolf, Y. I., and Aravind, L. (2001). *Genome research* **11**, 240-252.
56. Traut, T. W. (1994). *Molecular and cellular biochemistry* **140**, 1-22.
57. Wessels, D., Srikantha, T., Yi, S., et al. (2006). *Journal of cell science* **119**, 370-379.
58. Ambekar, C., Das, B., Yeger, H., and Dror, Y. (2010). *Pediatric blood & cancer* **55**, 1138-1144.
59. Austin, K. M., Gupta, M. L., Jr., Coats, S. A., et al. (2008). *The Journal of clinical investigation* **118**, 1511-1518.
60. Orelio, C., Verkuijlen, P., Geissler, J., et al. (2009). *PloS one* **4**, e7084.
61. Henson, A. L., Moore, J. B. t., Alard, P., et al. (2013). *Biochemical and biophysical research communications* **437**, 29-34.
62. Heiss, N. S., Knight, S. W., Vulliamy, T. J., et al. (1998). *Nature genetics* **19**, 32-38.
63. Mochizuki, Y., He, J., Kulkarni, S., et al. (2004). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10756-10761.
64. Montanaro, L., Chilla, A., Treere, D., et al. (2002). *The Journal of investigative dermatology* **118**, 193-198.

65. Yoon, A., Peng, G., Brandenburger, Y., et al. (2006). *Science* **312**, 902-906.
66. Gu, B. W., Ge, J., Fan, J. M., et al. (2013). *FEBS letters* **587**, 2112-2117.
67. Valdez, B. C., Henning, D., So, R. B., Dixon, J., and Dixon, M. J. (2004). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10709-10714.
68. Dixon, J., Jones, N. C., Sandell, L. L., et al. (2006). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 13403-13408.
69. McKusick, V. A. (1964). *Lancet* **1**, 832-833.
70. Martin, A. N., and Li, Y. (2007). *Cell research* **17**, 219-226.
71. Ball, S. (2011). *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2011**, 487-491.
72. Vlachos, A., Dahl, N., Dianzani, I., and Lipton, J. M. (2011). *European journal of human genetics : EJHG* **19**.
73. Gazda, H. T., Sheen, M. R., Vlachos, A., et al. (2008). *American journal of human genetics* **83**, 769-780.
74. Horos, R., Ijspeert, H., Pospisilova, D., et al. (2012). *Blood* **119**, 262-272.
75. Boulwood, J., Fidler, C., Strickson, A. J., et al. (2002). *Blood* **99**, 4638-4641.
76. Ebert, B. L., Pretz, J., Bosco, J., et al. (2008). *Nature* **451**, 335-339.
77. Starczynowski, D. T., Kuchenbauer, F., Argiropoulos, B., et al. (2010). *Nature medicine* **16**, 49-58.
78. Dutt, S., Narla, A., Lin, K., et al. (2011). *Blood* **117**, 2567-2576.
79. Bolze, A., Mahlaoui, N., Byun, M., et al. (2013). *Science* **340**, 976-978.

## Semblanza de la Dra. Nuria Sánchez Puig



La Dra. Nuria Sánchez realizó sus estudios de licenciatura en la Facultad de Química de la UNAM (1999) y de Maestría en Ciencias Bioquímicas (2001). Realizó su doctorado en el Centro de Ingeniería de Proteínas, Universidad de Cambridge, Inglaterra, bajo la tutoría de Sir Professor Alan R. Fersht (2005) en el área de biofísica de proteínas usando como modelo a los factores de transcripción p53 y HIF-1 $\alpha$ . Durante su doctorado fue becario de la Fundación “Gates Cambridge Trust”. Posteriormente, realizó una estancia postdoctoral en el Laboratorio de Biología Molecular

(LMB-MRC) en Cambridge, Inglaterra, donde incursionó en estudios bioquímicos del Síndrome Shwachman-Diamond. Actualmente es Investigador Titular A del Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM.





Butanda Ochoa A, González Andrade M, Guevara Flores A, Lara Lemus R, Matuz Mares D, Molina Jijón E, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLII, 245-250, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2015). (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)  
(ISSN-0188-137X)

## ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LOS VIRUS: ENTRE LA INCERTIDUMBRE Y LA CERTEZA

### ORIGIN AND EVOLUTION OF VIRUSES: BETWEEN UNCERTAINTY AND CERTAINTY

Antonio Lazcano Araujo

Miembro de El Colegio Nacional  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Autónoma de México  
E-mail: [alar@ciencias.unam.mx](mailto:alar@ciencias.unam.mx)

#### RESUMEN

Los virus no están vivos, pero tampoco están muertos. Como todos saben, se replican utilizando el aparato enzimático de las células que infectan y además de mutar pueden adquirir genes de sus hospederos y transportarlos de un organismo a otro o, en muchos casos, de una especie a otro, contribuyendo así al mantenimiento de una compleja red de tráfico de información genética que ha jugado un papel esencial en la evolución, por ejemplo, de la resistencia a antibióticos. Al igual que los seres vivos, los virus también evolucionan, pero sus poblaciones se modifican y se adaptan como resultado de las presiones de los sistemas inmunológicos y otros sistemas de defensa de sus hospederos.

Desafortunadamente el estudio de los virus y la comprensión de su naturaleza están teñidos por prejuicios extraordinariamente arraigados. Tanto sus dimensiones como su simplicidad estructural son criterios engañosos, y el temor que despiertan es una evidencia del sesgo con el que los vemos. Sin embargo, en su inmensa mayoría, no son patógenos y no existe un grupo biológico de donde estén ausentes. Un número importante de lo que llamamos infecciones virales emergentes en las poblaciones humanas son, en realidad, el resultado de una interacción compleja entre la evolución viral y factores de tipo socioeconómico, como la producción en masa de alimentos, la globalización y el transporte aéreo, el desarrollo de tecnologías médicas, como las transfusiones, y las invasiones a nichos ecológicos que nos exponen a los patógenos de otras especies animales.

Desde que fueron descubiertos, el tamaño reducido y la engañosa simplicidad que caracteriza a los virus llevó Felix D'Herelle, a John B. S. Haldane y a muchos más a creer que se tratada de ejemplos de las primeras entidades biológicas. Sin embargo, ningún virus puede proliferar en ausencia de sus hospederos celulares, lo que implica que ninguno de ellos pudo surgir antes de que aparecieran las primeras células. El otro problema lo plantean nuestros prejuicios antropocéntricos, y que se reflejan en el término mismo de *virus*, una palabra latina que significa veneno o sustancia pestilente, y que se usaba desde el siglo XIX, se usaba en medicina para referirse en forma genérica a cualquier agente infeccioso de dimensiones microscópicas.

Sin embargo, se nos olvida que la enorme mayoría de los virus no son patógenos, y que están presentes en prácticamente todos los grandes grupos biológicos. El listado de los problemas adicionales que dificultan la comprensión del origen y la evolución de los virus, y que incluyen la ausencia de un registro paleontológico, la extraordinaria promiscuidad que les permite superar las barreras taxonómicas que separan a las especies biológicas, y su enorme diversidad, que se refleja en las diversas estrategias de replicación y expresión del material genético. Hasta antes de disponer de secuencias de genes y proteínas los virus eran clasificados, desde una perspectiva antropocéntrica fácil de comprender, en función de las enfermedades que provocaban, o bien en función de su morfología, lo que puede resultar un criterio extraordinariamente frágil debido a las presiones evolutivas que pueden llevar de manera polifilética hacia cápsides con formas y tamaños similares.

Hace ya cincuenta años Baltimore clasificó a los virus en función de la composición química de su genoma y su replicación. Hoy sabemos que probablemente fue así: el desarrollo de la genómica comparada ha permitido demostrar que la mayor parte de las secuencias más conservadas comunes a todos los genomas celulares codifican proteínas involucradas en el metabolismo del RNA, es decir, que sintetizan, degradan o se unen a ribonucleótidos y RNA, es decir, que hubo un mundo más antiguo que el DNA mismo, en donde ya habían surgido las proteínas, pero los genomas eran moléculas de RNA. Esto es lo que llamamos el mundo de RNA/proteínas. Sin embargo, el que unos virus posean RNA como material genético y otros DNA no indica necesariamente que los primeros más antiguos que los segundos, sino que es una señal de su flexibilidad evolutiva y de la forma exitosa con la que han explotado nichos únicos. Más aún, el estudio de los genomas virales demuestra que a lo largo de la evolución han intercambiado genes con otros virus (como lo ocurre constantemente entre los virus de la influenza) y con sus hospederos. En la mayoría de los casos los genomas virales son mosaicos minúsculos que nos permiten conocer y comprender la evolución de las secuencias individuales, pero no necesariamente del virus mismo.

Aunque podemos agrupar a los diferentes virus conocidos en unos cuantos grupos, no es fácil encontrar la manera que encontrar la relación evolutiva entre estos. Ello sugiere que los virus son de origen polifilético, es decir, que a lo largo de los cuatro mil millones de años de historia de la biosfera han ocurrido varios eventos independientes que han llevado a la aparición de estas grandes familias. ¿Cómo surgieron estos grupos originales? Algunos grupos, como el que incluye a los poxvirus, que incluye al virus de la viruela, están dotados de un genoma de DNA de doble hélice que codifica para unas doscientas proteínas, entre las que se incluyen los componentes de la RNA polimerasa DNA dependiente cuyas subunidades muestran una relación evolutiva con sus equivalentes celulares

El extraordinario desarrollo de métodos de secuenciación cada vez más eficientes, unidos a la disponibilidad de formas de análisis bioinformáticos más precisas, ha permitido asomarnos a la evolución de los grupos virales usando marcadores filogenéticos como las distintas subunidades de las polimerasas. Si bien es cierto que estos esfuerzos representan un enfoque reduccionista que permite la reconstrucción de la historia evolutiva de genes de virus y no necesariamente de los virus mismos. El desarrollo de métodos de comparación de estructuras terciarias de polimerasas virales y celulares ha permitido la generación de cladogramas extraordinariamente robustos que son consistentes con algunos de los criterios médicos o moleculares de clasificación de los virus.

**Palabras clave:** virus, polifilética, cápsides, ribonucleótidos

### SUMMARY

Viruses are not alive but dead neither. As everybody knows they replicate using the enzymatic system of the infected cells. Besides of mutating the viruses can also acquire part of the genes from the hosts and move from one organism to another or as in many cases from one specie to another contributing in this way to the maintenance of a complex net of genetic information that has been essential in evolution for example the antibiotic resistance. As the living beings the viruses are also part of evolution but their populations can modify and adapt as a result of the pressure from the immunological systems of the hosts.

Unfortunately the study and the comprehension of viruses are full of strong prejudice. Their dimension and their structural simplicity are beguiling criteria and the fear we have to them is an evidence of the mistrust with which we see them. However the majority of viruses are not pathogen and there is not a biological group where they are absent. An important number of what we call emergent viral infections in human population came from a complex interaction between the viruses' evolution and socio-economics factors as for example the mass production of food, the globalization, air transport, medical technologies (blood transfusions) and the invasions to ecological niches that expose to us to other pathogens species.

Since viruses were discovered their characteristic small size and simplicity made Felix D'Herelle, B. S. Haldane and many others to believe that they were an example of the first biological entities, however none of the viruses can proliferate in the absence of a host which means that none of them could exist before the first cells appeared.

Another problem comes from our anthropocentric prejudice since we named them viruses a word that comes from Latin and it means poison or smelly substance. This word was used since the XIX to make a general reference to any infectious agent of microscopic dimensions.

We used to forget that most of the viruses are not pathogens and that they are in all biological groups as said before. The list of problems that make difficult the study of the viruses includes the comprehension of the origin and evolution of them, the absence of a paleontological registry, their extraordinary promiscuity that makes them to overcome the taxonomic barriers that separate the other biological species and their great diversity reflected in the different strategies to replicate their genetic material. Before having the genomic and proteomic sequences of viruses

they were classified from an anthropocentric view according to the disease they caused or according to their morphology all of which could mean a fragile criteria due to the evolutionary pressures that will led us to in a polyphyletic way to capsid with similar forms and sizes.

Fifty years ago Baltimore classified the viruses as a function of their genome and replication. Today we know that probably it was like that: the development of the compared genomics have shown us that most of the sequences more conserved and common to all cellular genomes, codified for proteins involved in the RNA metabolism that means proteins that synthetize, degrades or bind to ribonucleotides and RNA. This also means that there was an ancient world even before DNA itself in which there were proteins but the genomes were RNA which we can name a RNA/proteins world. However that some viruses have RNA as genetic material and some others have DNA material does not necessarily means that the formers existed before than the latter, more than that this may be a signal of evolutionary flexibility and the success with which they have exploited such advantage. Besides the study of viruses genome has shown that during evolution viruses have interchanged genes among them (as occurs among influenza viruses) and with other hosts. In most of the cases the viral genomes are very tiny mosaics that allow us to know and to understand the evolution of individual sequences but not necessarily the evolution of virus itself.

Even though we can group the different known viruses it is not easy to find an evolutionary relationship among them. This suggests that viruses come from a polyphyletic origin and that during four million years of biosphere history it has occurred different independent events that led to the appearance of such big families. ¿How do this original groups appeared?. Some groups as that of poxviruses (such as viruela virus) have a double helix DNA that codifies for about 200 proteins which includes RNA-polymerase DNA-dependent of which subunits show an evolutionary relationship with their cellular equivalents.

The extraordinary development of sequencing methods as well as the bioinformatics analysis techniques has allowed us to testify the evolution of different viral groups using phylogenetic markers as for example the polymerases subunits. It is true that such methods represent a reductionist point of view that permit the reconstruction of the evolutionary history of the genes of viruses but not necessarily of the evolution of viruses themselves. Even though the methods to compare the tridimensional structure of viral and of cellular polymerases have generated strong cladograms that are consistent with medical and molecular criteria used in the classification of viruses.

**Keyword:** viruses, polyphyletic, capsid, ribonucleotides

### Semblanza de Dr. Antonio Lazcano-Araujo



Antonio Lazcano Araujo es Profesor en la Facultad de Ciencias de la UNAM, en donde estudio biología y obtuvo el doctorado en ciencias. Allí dirige el Laboratorio de Origen de la Vida, en donde se dedica con su grupo al estudiar la síntesis de compuestos orgánicos en condiciones de la Tierra primitiva y a la reconstrucción de la evolución temprana de la vida mediante la

genómica comparada. Ha sido profesor invitado en diversas universidades europeas y de los EEUU, y es el científico mexicano con mayor número de publicaciones en las revistas *Science* y *Nature*. Es autor de más de 190 trabajos de investigación y autor de tres libros en español, incluyendo *La Bacteria Prodigiosa*, *La Chispa de la Vida* y *El Origen de la Vida*, del cual se han vendido más de 800,000 ejemplares. Entre las distinciones recibidas se incluyen la Medalla Alfonso L. Herrera a la Investigación Biológica, la Medalla de Fundador la Universidad de San Francisco de Quito (2007), el Premio Universidad Nacional en Investigación en Ciencias Naturales (UNAM, 2007), la Primer Medalla Francesco Redi (Florencia, 2008), el Doctorado *Honoris causa* de la Universidad de Milan (2008) y la Medalla al Mérito Universitario (Universidad Veracruzana, 2009). Fue dos veces Presidente de la International Society of the Study of the Origins of Life, siendo el primer científico latinoamericano en acceder a este puesto. En Octubre de 2014 ingreso a El Colegio Nacional