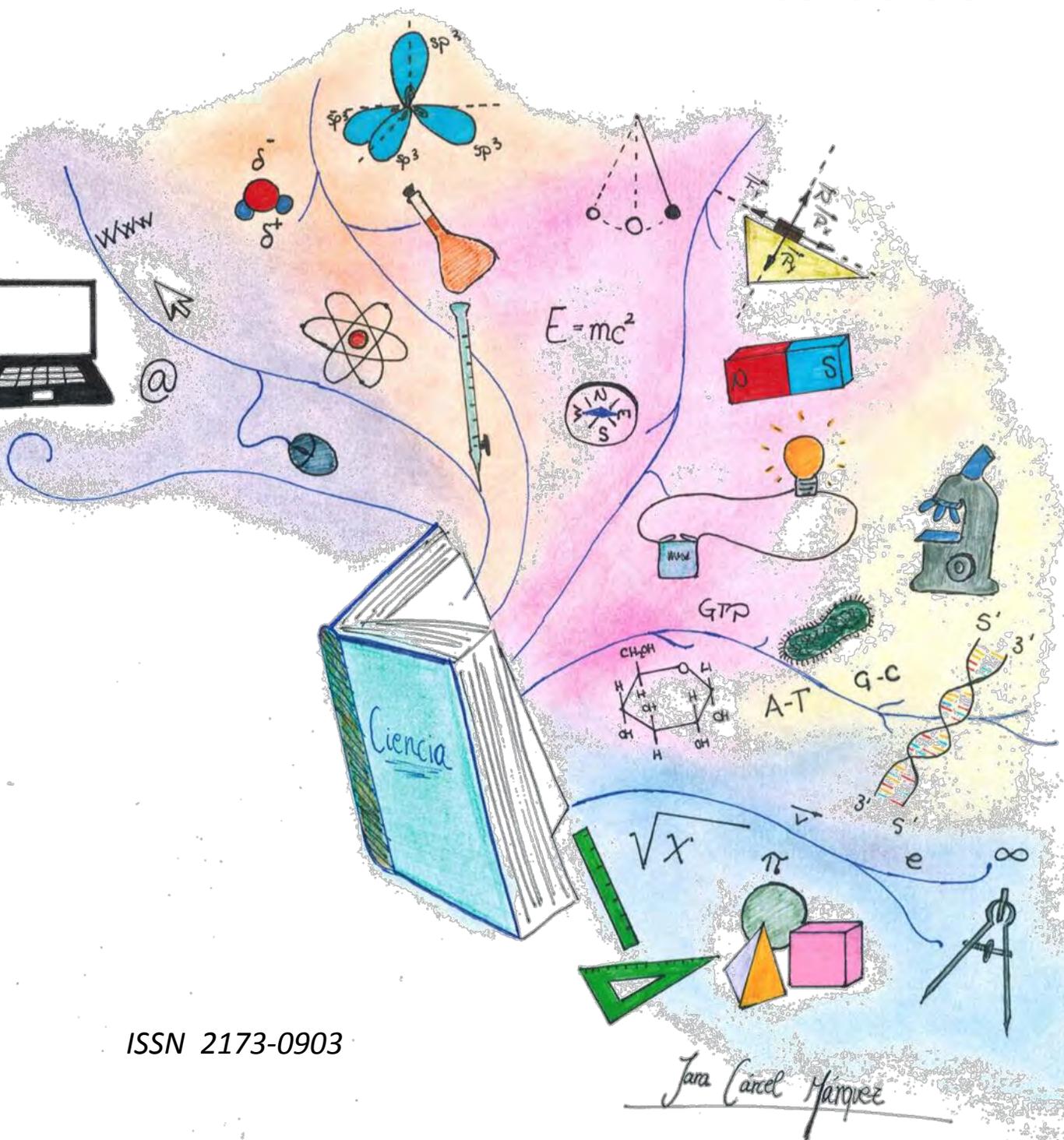


Moleola

Revista de Química de la
Universidad Pablo de Olavide

Número 12

Diciembre 2013



ISSN 2173-0903

Jara Carrel Marquez

Dibujo de portada

Jara Cárcel Márquez

Logotipo y Título de la revista

Juan Manuel García Arcos, Rafael Hoyos Manchado y Rafael Iigo
Roció Escudero Ávila, Inés Maldonado Lasunción y Javier Revello Sánchez

Plantilla de la revista

Norberto Díaz Díaz

Responsables de las secciones que aparecen en este número

MoleQla General: Patrick J. Merklings
MoleQla Bioinformática: Norberto Díaz Díaz
MoleQla Viva: Guillermo López Lluch

Responsables de maquetación de las secciones que aparecen en este número

MoleQla General: Alina Georgiana Ioja
MoleQla Bioinformática: Elena Santisteban Trigo
MoleQla Viva: David Cabrerizo Granados
Maquetador Global: Rafael Rastrero Prieto

Información sobre todas las secciones de MoleQla en <http://www.upo.es/MoleQla>

Editores

Sofía Calero Díaz
Ana Paula Zaderenko Partida
Juan Antonio Anta Montalvo
Patrick J. Merklings

ISSN 2173-0903

Editado el 21 de Diciembre de 2013

Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

EDITORIAL

MoleQla cumple tres años y lo celebra con un formato mas profesional y una reducción en el número de artículos en pro de la calidad. En 2014 presentaremos nuevas secciones y tenemos una novedad que desde esta editorial queremos compartir con todos vosotros. La Universidad Pablo de Olavide entregará un premio de reconocimiento al mejor artículo que se publique en el nuevo año. Os iremos informando de los detalles en los próximos números.



Para mantener la tradición navideña que establecimos hace ya tres años el Equipo MoleQla quiere entregaros este número como regalo navideño y con él deseamos una muy felices fiestas.

ÍNDICE

1. MoleQla General

1.1 Metalomesógenos: cristales líquidos en las nuevas tecnologías

1.2 << Shrilk>>, el sustituto perfecto del plástico

1.3 Todo lo que deberías saber sobre el mercurio

2. MoleQla Bioinformática

2.1 Maximizar el uso de la información disponible en KEGG

2.2 GO-Means: Agrupación de genes basado en medidas de similitud semánticas

2.3 Análisis de Medidas de Similitud Semántica Actuales

3. MoleQla Viva

3.1 El caso del primer hombre que se curó de SIDA

3.2 Las semaforinas

3.3 La flora bacteriana y el sistema inmune

3.4 Uso de anticuerpos monoclonales como tratamiento antibacteriano

3.5 Deficiencia Selectiva de IgA

3.6 El Virus de la hepatitis C contra la célula. El papel del interferón en la defensa celular

3.7 Vacunas de ADN

3.8 El uso de nanopartículas para la mejora y optimización de vacunas

3.9 Vacunas comestibles

3.10 Fármacos comerciales contra el SIDA y sus dianas específicas



MOLEQLA GENERAL

Metalomesógenos: cristales líquidos en las nuevas tecnologías

Cristián Cuerva de Alaíz

Resumen— En los últimos años se están diseñando materiales cristal líquido con propiedades adecuadas para desarrollar tecnologías nuevas, diferentes e innovadoras. Hablamos de pantallas flexibles y delgadas que podrían “imprimirse” sobre la superficie de un papel, células solares más eficientes y baratas, agentes de imagen y contraste que permitiesen detectar tumores de tan sólo 1 mm de diámetro, músculos artificiales, sensores para la detección de gases, lociones regenerativas para la piel...En definitiva, toda una gama de aplicaciones que persiguen un mismo fin: crear una tecnología más competente y mejor adaptada a las crecientes demandas de la sociedad actual.

Palabras Claves— Metalomesógenos, Cristales líquidos, Pantallas, OLED, Células solares.

1. INTRODUCCIÓN

Desde que el químico austriaco Friedrich Reinitzer descubrió en 1888 los primeros materiales con propiedades cristal líquido [1], todas las investigaciones en este campo se centraron en la preparación de nuevos compuestos que reprodujesen sus observaciones, la mayoría de ellos puramente orgánicos (*mesógenos*). Sin embargo, en 1910 el químico alemán Daniel Vorländer describió por primera vez las propiedades termotrópicas de ciertos carboxilatos de metales alcalinos y aril derivados de mercurio (Figura 1). Este acontecimiento abrió un nuevo camino de posibilidades en el estudio de especies mesogénicas que contienen metales en su estructura, hoy conocidos bajo el nombre de *metalomesógenos* [2].

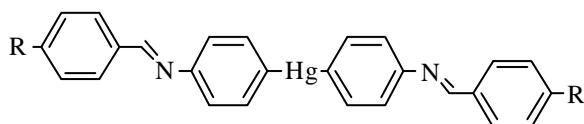


Fig. 1. Estructura molecular de uno de los primeros metalomesógenos estudiados por Vorländer

La incorporación de metales coordinados a ligandos orgánicos permite la obtención de nuevos materiales bifuncionales, sobre la base de combinar la autoorganización de los cristales líquidos (fluidez, orden orientacional) con las propiedades de los metales (eléctricas, magnéticas, luminiscentes, etc). Por otro lado, la capacidad del metal para adoptar diferentes entornos de coordinación constituye un factor determinante para el diseño de nuevas geometrías moleculares, que difícilmente podrían lograrse únicamente con moléculas orgánicas [3]. Los metalomesógenos son, por tanto, un perfecto ejemplo de simbiosis en la ciencia de los materiales avanzados.

En los últimos años, aprovechando el ordenamiento característico que se alcanza en las fases líquido cristalinas, se están sintetizando nuevos metalomesógenos que

actúen, además, como portadores de otras propiedades asociadas tales como la conductividad eléctrica o la estabilidad coloidal. Los científicos buscan especies polifuncionales fácilmente procesables y de gran interés industrial que abran un nuevo horizonte de aplicaciones en campos como el de la optoelectrónica, la energía o la medicina.

Veamos a continuación algunos ejemplos.

2. PANTALLAS OLED

A pesar de las mejoras introducidas en las actuales pantallas TFT-LCD (*Thin Film Transistor-Liquid Crystal Display*, pantallas de cristal líquido con transistor de película delgada), actualmente existe un mayor interés en el desarrollo de nuevos dispositivos basados en tecnología OLED (*Organic Light-Emitting Diode*, diodo orgánico de emisión de luz). Su construcción se puede llevar a cabo introduciendo un cristal líquido con propiedades luminiscentes [4], [5] y un semiconductor orgánico entre dos electrodos, uno que hará de cátodo y otro que actuará como ánodo (Figura 2). Así, al aplicar un voltaje a través del OLED se generará una corriente eléctrica que circulará entre los dos electrodos, creándose electrones en la capa de emisión (constituida por el cristal líquido luminiscente) y huecos positivos en la capa de conducción (formada por el semiconductor orgánico). Como resultado de las fuerzas electrostáticas que actuarán sobre los portadores de

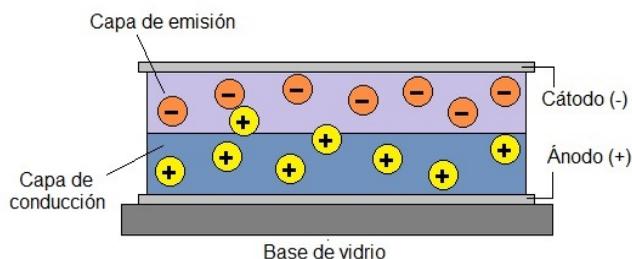


Fig. 2. Esquema del funcionamiento de un dispositivo OLED

carga, el electrón quedará atrapado en el interior del hueco y pasará de un estado energético a otro de menor energía, emitiendo radiación a una longitud de onda dentro del rango del visible.

El empleo de un cristal líquido luminiscente permitiría la fabricación de superficies emisoras, es decir, pantallas que no requerirían una fuente de iluminación trasera como las convencionales LCD. Pantallas delgadas, de tan sólo 5 mm de grosor, que podrían incorporarse al vidrio de una ventana o al de unas simples gafas de sol. Pantallas flexibles y enrollables que pudiesen formar parte del papel de un periódico y reproducir vídeos de pequeña duración. En definitiva, dispositivos con un mayor rango de colores, mayor brillo y contraste, menores tiempos de respuesta y mayor resolución que abrirán el camino hacia una nueva generación de herramientas de información y comunicación [6].

3. CASCOS DE SOLDADURA

Las pantallas de cristal líquido también pueden ser incorporadas sobre cascos de soldadura, dando lugar a un innovador filtro que se oscurecerá rápidamente cuando el soldador comience su trabajo. En este caso, la pantalla lleva incorporada una célula fotoeléctrica y un filtro UV/IR adicional para mejorar la protección, pero el principio de funcionamiento es el mismo que el desarrollado en las pantallas LCD. Cuando la célula fotoeléctrica detecta la luz desprendida al encender el soldador, se genera un campo eléctrico y las moléculas de cristal líquido se ordenan en la dirección del campo, lo que impide la propagación de la luz polarizada. Como consecuencia, ésta no puede atravesar el segundo polarizador y la pantalla se oscurece (célula negra), protegiendo los ojos y la piel del soldador, tal y como se puede apreciar en la figura 3.

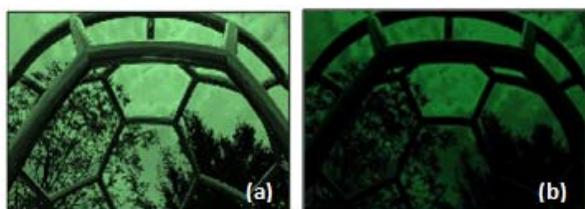


Fig. 3. Funcionamiento de la pantalla LCD de un casco de soldadura (a) en reposo y (b) al soldar

4. CÉLULAS SOLARES

La mayoría de las células solares que se fabrican a día de hoy utilizan silicio como material base. Sin embargo, aunque el silicio es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre, es necesario llevar a cabo un procesamiento adicional para lograr el grado de pureza necesario, razón por la cual los costes de fabricación se incrementan notablemente [7]. Como consecuencia de ello, a pesar de constituir una forma de obtener energía verde y evitar el uso de combustibles fósiles, la realidad es que se trata de una tecnología al alcance de muy pocos países.

En un intento por conseguir materiales que sean baratos y que ofrezcan mejores rendimientos y propiedades se

pensó que los semiconductores orgánicos podrían ser candidatos adecuados para lograr este propósito [8], [9]. Sin embargo, al ser cristales individuales era más difícil y costoso trabajar con ellos que con un sólido tridimensional inorgánico, por lo que a pesar de introducir mejoras en la eficacia de las celdas, el empleo de estos materiales orgánicos no supuso una mejora de la rentabilidad.

En la actualidad, se está comenzando a estudiar un nuevo tipo de compuestos basados en metalomesógenos que se autoorganizan en columnas, adquiriendo así un empaquetamiento que se asemeja al apilamiento aromático que existe en los semiconductores orgánicos [10], [11].

Desde el punto de vista electrónico, cuando el cristal líquido absorbe parte de la radiación solar incidente, los electrones se excitarán y formarán huecos positivos (Figura 4). Sin embargo, ahora no se busca la recombinación de los portadores de carga como ocurría en las pantallas OLED, sino todo lo contrario, cargas separadas que puedan moverse a través de un circuito externo y permitan la generación de una corriente eléctrica.

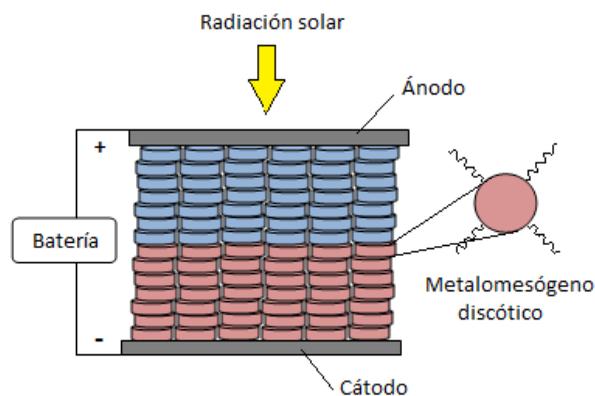


Fig. 4. Esquema del funcionamiento de una célula solar basada en metalomesógenos discóticos.

Para ello es necesario el empleo de cristales líquidos cuyas moléculas tengan forma de disco (metalomesógenos discóticos), favoreciendo, así, la movilidad de los portadores de carga a lo largo de las columnas del cristal líquido. Este diseño permitiría la creación de células solares más eficaces y flexibles, pero sobre todo, más baratas y accesibles a la población mundial.

5. AGENTES DE IMAGEN Y CONTRASTE

En la actualidad, el diagnóstico del cáncer se puede llevar a cabo empleando tres tipos de técnicas complementarias entre sí: analíticas (bioanálisis de fluidos corporales), físicas (biopsia de tejidos) y de imagen (Rayos X, Resonancia Magnética Nuclear y Colposcopia). Sin embargo, la sensibilidad y especificidad que presentan no es suficiente para detectar un tumor en su etapa temprana y, menos aún, en su estado precancerígeno. La capacidad que presentan algunos cristales líquidos (especialmente cristales líquidos basados en lantánidos) para formar disoluciones coloidales y emitir luz ha abierto una nueva línea de aplicaciones en el campo de la medicina como agentes de contraste y de imagen para la detección de tumores en etapas tempranas [12], [13].

Además, la posibilidad que ofrecen para incorporar moléculas bioactivas autoensambladas en la estructura de estos compuestos, los convierte en materiales multifuncionales capaces de encapsular, proteger, transportar y liberar un fármaco de forma controlada. Se prevé que en un futuro próximo, una vez superadas las pruebas realizadas en animales, se comiencen los ensayos clínicos con seres humanos.

6. CONCLUSIONES

El interés de los metalomesógenos en las nuevas tecnologías es un hecho claramente puesto de manifiesto. En los últimos años, la presencia de estos materiales en dispositivos electroópticos, pantallas LCD y OLED, ventanas inteligentes, agentes de imagen, etc., constituye una representación de su importancia en el mundo actual, y el estudio de las organizaciones supramoleculares ha evolucionado hacia una aportación significativa en las nuevas tecnologías de los fotónicos electrónicos moleculares.

La mayor dificultad en el diseño y síntesis de metalomesógenos adecuados para su aplicabilidad deriva, en general, de las altas temperaturas requeridas para la formación de las mesofases y, consecuentemente de la descomposición producida en la mayoría de los casos. Es evidente, pues, la necesidad de desarrollar nuevas estrategias sintéticas para obtener materiales que presenten cada vez mejores propiedades con objeto de desarrollar una tecnología más competente y mejor adaptada a las crecientes demandas de la sociedad actual.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a los miembros del Grupo de Investigación "Materiales Moleculares basados en Compuestos de Coordinación" del Departamento de Química Inorgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, la participación y ayuda prestada para la elaboración de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] M. Caño, R. Hoyos, E.L. Mangas y P. Pérez, "Cristales Líquidos: Entre lo Sólido y lo Líquido", *MoleQla*, no. 6, pp. 170-175, Jun 2012, ISSN: 2173-0903.
- [2] L. Oriol and J.L. Serrano, "Metallomesogenic Polymers" *Adv. Mater.*, vol. 7, no. 4, pp. 348-369, Apr 1995, doi:10.1002/adma.19950070403.
- [3] R. Giménez, D.P. Lydon and J.L. Serrano, "Metallomesogens: a Promise or a Fact?" *Curr. Opin. Solid State Mat. Sci.*, vol. 6, no. 6, pp. 527-535, Dec 2002, doi:10.1016/S1359-0286(03)00009-3.
- [4] A. Crispini, M. Ghedini and D. Pucci, "Functional Properties of Metallomesogens Modulated by Molecular and Supramolecular Exotic Arrangements", *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 5, no. 54, Oct 2012, doi: 10.3762/bjoc.5.54.
- [5] G. Barberio, A. Bellusci, A. Crispini, M. Ghedini, A. Golemme, P. Prus and D. Pucci, "Columnar Mesomorphism in Hexacatenar Tetrahedral (2,2'-Bipyridine)zinc Complexes and Homologous Palladium Derivatives", *Eur. J. Inorg. Chem.*, no.1, pp. 181-188, Jan 2005, doi: 10.1002/ejic.200400528.

- [6] P. Chamorro, J. Martín, P. Martín y L.M. Navas, *Fundamentos de la Tecnología OLED*. Valladolid, España: Mata Digital, SL, 2008, ISBN: 978-84-936644-0-4.
- [7] M. Castro, "Células Solares de Silicio para Alta Concentración: Industrialización y Células de Contacto Posterior, ETSI Telecomunicaciones, Universidad Politécnica de Madrid, España, 2009.
- [8] H. Isla, M. Gallego, E.M. Pérez, R. Viruela, E. Ortí and N. Martín, "A bis-exTTF Macrocyclic Receptor that Associates C60 With Micromolar Affinity", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 6, pp. 1772-1773, Feb 2010, doi: 10.1021/ja910107m.
- [9] E. Huertas, H. Isla, E.M. Pérez, C. Bo, N. Martín and J. de Mendoza, "Tripodal exTTF-CTV Hosts for Fullerenes", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 15, pp. 5351-5353, Mar 2010, doi: 10.1021/ja1006993.
- [10] K. Venkatesan, P.H.J. Kouwer, S. Yagi, P. Müller and T.M. Swager, "Columnar Mesophases from Half-discoid Platinum Cyclometalated Metallomesogens", *J. Mater. Chem.*, no. 18, pp. 400-407, Nov 2007, doi: 10.1039/b714291a.
- [11] S. Debnath, H.F. Srouf, B. Donnio, M. Fourmigué and F. Camerel, "Room-temperature Columnar Mesophases of Nickel-bis(diothiolene)metallomesogens", *RSC Adv.*, no. 10, pp. 4453-4462, Feb 2012, doi: 10.1039/C2RA20332D.
- [12] G. Liu, C.E. Conn and C.J. Drummond, "Lanthanide Oleates: Chelation, Self-assembly, and Exemplification of Ordered Nanostructured Colloidal Contrast Agents for Medical Imaging", *J. Phys. Chem. B*, vol. 49, no. 113, pp. 15949-15959, Nov 2009, doi: 10.1021/jp906344u.
- [13] C.E. Conn, V. Panchagnula, A. Weerawardena, L.J. Waddington, D.F. Kennedy and C.J. Drummond, "Lanthanide Phytanates: Liquid-Crystalline Phase Behavior, Colloidal Particle Dispersions, and Potential as Medical Imaging Agents", *Langmuir*, Vol. 9, no. 26, pp. 6240-6249, Dec 2009, doi: 10.1021/la904006q.



Cristián Cuerva de Alaiz recibió el título de Graduado en Química por la Universidad Complutense de Madrid en 2012, y de Máster en Ciencia y Tecnología Químicas (especialidad en Nanociencia y Nanomateriales) en 2013. Actualmente es doctorando de Química Avanzada en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

<<Shrilk>>, el perfecto sustituto del plástico

Darío Barreiros Zamora

Combinando caparazones de camarón con proteínas procedentes de la seda nace una nueva y extraordinaria sustancia llamada *shrilk*. Es una invención de los investigadores del instituto Wyss de Harvard quienes han superado estos dos materiales en una combinación que imita el exoesqueleto de crustáceos e insectos. No solo su producción es poco costosa sino que además tiene propiedades magnificas tan pronto como es resistente y flexible como el plástico y además es biodegradable por lo que no contamina.

Palabras Claves— Nuevo material, Biodegradable, Resistente, Proteico, Orgánico

Desde los orígenes de su existencia el ser humano ha innovado y experimentado con toda clase de elementos y compuestos y con sus propiedades para intentar modificarlos e incluso crear otros nuevos lo más útiles posibles para cubrir con ellos sus necesidades.

Así nació en 1907 el plástico compuesto creado a partir de la polimerización de los átomos de carbono en largas cadenas moleculares de compuestos orgánicos derivados del petróleo y otras sustancias naturales.



Figura 1: Típica utilización del plástico.

Es tanta la importancia de este material que se puede decir que su invención marcó el inicio de la era del plástico ya que debido a sus diversas variedades, su bajo coste de producción y sus múltiples propiedades lo hacían prácticamente perfecto para muchas aplicaciones.

El plástico tiene una baja densidad, es muy maleable y dúctil, es un excelente aislante tanto eléctrico como acústico y también térmico (aunque no resiste temperaturas demasiado altas), y además es impermeable, son estas características y el hecho de que es barato y fácil de trabajar pudiendo crear nuevos tipos o modelos de plástico, en función de para qué se necesiten, simplemente alterando su composición de manera que se aumenten o disminuyan unas propiedades u otras, lo han hecho uno de los

materiales base de nuestra sociedad actual.

De esta manera, vivimos en una sociedad en la que el plástico está presente prácticamente en todo lo que podemos imaginar. Se usa en la construcción, en la industria, en la robótica, todos los envases que utilizamos están hechos o por lo menos llevan en su composición algún tipo de plástico o derivados ^[1].

Ahora bien aunque tiene grandes propiedades, tiene también un grandísimo inconveniente, el plástico es sumamente contaminante ya que no es biodegradable, es decir, puede tardar millones de años en descomponerse lo que es un enorme problema ya que su presencia en los ecosistemas los altera y perjudica gravemente. Su reciclado además es muy costoso y su combustión libera una enorme cantidad de contaminantes convirtiéndolo así en uno de los principales contaminantes a nivel mundial y el hecho de que sea un producto básico en el día a día de la humanidad produce una gran cantidad de desechos que producen una gran contaminación a nivel mundial.



Figura 2: Resultado de la contaminación, animales acuáticos rodeados de desechos plásticos.

Este problema podría solucionarse en un futuro no muy lejano con la ayuda de un nuevo material creado por los investigadores del instituto Wyss de Harvard y al cual

han llamado Shrilk [3]. Este compuesto está formado a través de la combinación de caparazones de camarón y proteínas naturales procedentes de la seda por lo que es un compuesto completamente natural pero que puede reproducirse en el laboratorio de manera que puede producirse a nivel industrial como el sustituto perfecto del plástico.



Figura 3: Imagen de una lámina de shrilk (muy similar al plástico).

La cutícula de los insectos está preparada para el reto de proporcionar protección sin añadir peso o volumen, tal como es el caso de la cutícula presente en el exoesqueleto rígido en una mosca o un saltamontes.



Figura 4: Ala de insecto.

Este avance de la ciencia, ha demostrado que es tan ligera que no inhibe el vuelo y tan delgada, que permite una flexibilidad mayor. Dentro de las características también destacan su capacidad para variar de estado rígido a elástico.

Capas de quitina, un polímero de polisacárido y proteínas organizados en una estructura laminar como la madera, componen la cutícula de los insectos, que mediante interacciones mecánicas y químicas, hacen de la cutícula un material único.

Shrilk, llamado así por su composición de proteínas de fibroína de seda y de la quitina, comúnmente presente en las conchas de los camarones, fue creado a través de estas complejas interacciones, dando como resultado este diseño laminar único [3].

Esta creación de la ciencia, es similar en resistencia y dureza a una aleación de aluminio, pero con solo la mitad de peso. Es fácil de moldear en formas complejas, tales como tubos. Al controlar el contenido de agua en el proceso de fabricación, los investigadores fueron capaces incluso variar su rigidez, de elástico a rígido.

Los atributos de este material tienen múltiples usos, entre ellos podría ser una alternativa económica y ambientalmente segura del plástico. Shrilk podría ser utilizado para hacer bolsas de basura, envases, y pañales que se degraden rápidamente. Además, podría ser utilizado para suturar heridas que llevan grandes cargas, como en la reparación de una hernia.

Conclusión

Como ya hemos visto este nuevo material tiene la gran mayoría de las propiedades o características del plástico siendo resistente y flexible (imitando el caparazón de los crustáceos e insectos), pero con la gran ventaja de ser biodegradable lo que lo hace perfecto para sustituir a los plásticos en muchas de sus funciones como son las de envasado alimenticio, bolsas, pañales desechables, apósitos y muchas más aplicaciones en diversos campos como en la medicina o farmacia.

Imaginen todos estos productos y objetos hasta ahora hechos con plásticos y cuya eliminación y reutilización es muy costosa y contaminante, hechos de este innovador material *shrilk* pasando a ser biodegradables por lo que no tendrían un efecto negativo en el medio ambiente y además serían fácilmente reciclables.

Sin duda es algo por lo que apostar ya que con un buen desarrollo podría ayudarnos a salir de esta era del plástico que tan contaminante y perjudicial para nuestro planeta es y entrar quizás en una nueva era la del shrilk en la que no se contaminaría más que un insecto al morir dejando su exoesqueleto que se degrade. Y quién sabe quizás en un futuro los pañales de degraden solos unas horas después de su utilización, las bolsas de basura ya no contaminen ni destrocen ecosistemas, o los pacientes de operaciones no tengan que acudir al médico a quitarse los puntos.

Referencias

- [1]<http://ngm.nationalgeographic.com/2013/05/125-explore/super-materials>
- [2]<http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=9-materials-that-will-change-manufacturing>
- [3]<https://www.googleimágenes.es>
- [4]<http://en.wikipedia.org/wiki/Shrilk>
- [5]<http://www.cubadebate.cu/noticias/2011/12/14/shrilk-un-material-tan-fuerte-como-el-aluminio-que-imita-la-cuticula-de-los-insectos/>
- [6]<http://wyss.harvard.edu/viewpressrelease/72/>

Todo lo que deberías saber sobre el mercurio

Ana Sánchez Molina

Resumen— Todo el mundo ha oído hablar del mercurio. Habrá quienes piensen en termómetros al escuchar hablar de él, quienes imaginen un líquido plateado y espeso o incluso algunos pensarán en pescado. Sin embargo, a pesar de lo extendido que está el conocimiento sobre este elemento, hay poca gente que de verdad esté al tanto de lo que el mercurio es capaz de hacer. Aquí encontrarás información útil sobre la llamada plata líquida.

Palabras Claves— Mercurio, Elemento, Metal, Toxicidad, Minamata.

1. INTRODUCCIÓN

El mercurio, conocido también como azogue, es el elemento químico que se sitúa en la posición 80 de la Tabla Periódica. El símbolo con el que es representado en esta, Hg, procede de un término en desuso, *hydrargirio*, que también se empleaba para hacer referencia al elemento en cuestión. La palabra *hydrargirio* tiene su origen en la palabra latina *hydrargyrum*, a su vez procedente



Fig. 1. Mercurio

del griego *hydrargyros* (*hydros* significa agua y *argyros* plata). El nombre con el que se le conoce hoy en día, mercurio, se le dio en honor al dios romano llamado así.

Este elemento de color plateado es el único metal que permanece en estado líquido bajo condiciones estándar de temperatura y presión. Aparte del mercurio, solo el bromo (que es un no metal) permanece líquido en estas condiciones [1],[2].

En la naturaleza, el mercurio aparece en forma de un mineral conocido como cinabrio (sulfuro de mercurio, Figura 2), y el elemento en sí se consigue calentando el cinabrio y condensando el vapor que este desprende. España e Italia son los países que más mercurio generan, en torno al 50% del suministro mundial del metal en cuestión [2].

El empleo del mercurio se extiende a diversos ámbitos, desde su antiguo uso en la fabricación de termómetros hasta para purificar metales como la plata o el oro entre



Fig. 2. Cinabrio

muchas otras aplicaciones. Sin embargo, su “mala fama” se debe a que es altamente tóxico, acarreando graves consecuencias para la salud.

2. EL MERCURIO COMO SUSTANCIA QUÍMICA

2.1. Información básica

Como ha sido mencionado anteriormente, el mercurio ocupa el puesto 80 en la Tabla Periódica, situándose entre el oro y el talio, bajo el cadmio y sobre el cinabrio. Por lo tanto, pertenece al grupo 12, al periodo 6 y al bloque d. Presenta 121 neutrones, 80 protones y 80 electrones. Su configuración electrónica, que puede ser conocida conociendo su posición en la Tabla Periódica, es $[\text{Xe}] 4f14 5d10 6s2$.

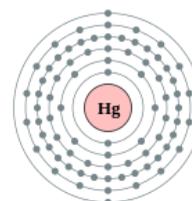


Fig. 3. Configuración electrónica del mercurio

El mercurio es un metal de transición y presenta una estructura cristalina romboédrica, con una densidad de 13.456 g/cm^3 a 293 K. Su masa atómica es de 200.59 amu, y tiene un punto de fusión de $-38.87 \text{ }^\circ\text{C}$ (234.28 K) y un punto de ebullición de $356.58 \text{ }^\circ\text{C}$ (629.73 K) [3],[4],[5].

2.2. Compuestos de mercurio

Principalmente, el mercurio presenta dos estados de oxidación: I y II. Bajo condiciones extraordinarias se han logrado detectar estados de oxidación superiores, aunque rara vez son hallados en la naturaleza.

Las sales más importantes formadas por el mercurio son el dicloruro de mercurio (HgCl_2), el dicloruro de dimercurio, (Hg_2Cl_2), el fulminato de mercurio ($\text{Hg}(\text{ONC})_2$) y el sulfuro de mercurio (HgS).

Pero eso no es todo, porque el mercurio, haciendo una

vez más gala de unas características peculiares, puede formar también unos compuestos muy especiales. Con una descarga eléctrica lo suficientemente potente el vapor de mercurio se puede unir a los gases nobles neón, argón, kriptón y xenón. Los compuestos resultantes, mantenidos por fuerzas de Van der Waals, son el HgNe, el HgAr, el HgKr y el HgXe, respectivamente [7].

2.3. Propiedades

La principal propiedad de este elemento salta a la vista, y se deriva de la amplitud del rango de temperaturas existente entre los puntos de fusión y ebullición antes mencionados: el mercurio es líquido a temperatura ambiente. Sin embargo, esa no es la única propiedad de este metal.

El mercurio es un conductor aceptable de la electricidad, aunque pobre en cuanto a la conducción del calor. Además de esto, también cabe destacar que este elemento forma aleaciones con otros metales con suma facilidad, aleaciones que reciben el nombre de amalgamas. Aquí es necesario hacer referencia a una amalgama en concreto, la que se forma cuando el mercurio entra en contacto con el aluminio. Como esta amalgama destruye la capa de óxido que protege al aluminio de oxidarse en su totalidad, incluso pequeñas cantidades de mercurio pueden corroer seriamente al aluminio [6],[11].

El mercurio atrae a sus electrones de valencia 6s con mucha fuerza, lo que conlleva que los enlaces mercurio-mercurio sean muy débiles debido a que los átomos no comparten realmente sus electrones, como en el caso del resto de los metales, donde se forma el llamado "mar de electrones". De hecho, el mercurio es el único metal que no forma moléculas diatómicas en estado gaseoso.

Otra consecuencia de la debilidad de sus enlaces es que el calor se sobrepone con facilidad a estos, por lo que el mercurio hierve y se derrite a temperaturas más bajas que el resto de metales. También es responsable de que su habilidad para conducir la electricidad y el calor sea mucho menor que la esperada para un metal en su posición en la Tabla Periódica.

Si comparamos el mercurio con el oro y el talio entenderemos un poco mejor a qué se deben estas propiedades tan particulares con respecto a sus elementos vecinos (Tabla 1).

Los tres átomos presentan orbitales 6s de baja energía, como podemos observar. Sin embargo, el orbital 6s del oro se encuentra semilleno. Aceptar un electrón más en ese orbital hará descender su valor total, lo que ocasionará que, en consecuencia, el enlace metálico resultante formado entre átomos de oro sea fuerte, por lo que sus temperaturas de fusión y ebullición serán superiores a las del mercurio.

El talio, a pesar de tener mayor tamaño que el mercurio, presenta además de sus electrones 6s un electrón 6p. Este

TABLA 1
COMPARACIÓN ENTRE LAS CONFIGURACIONES DEL ORO, EL MERCURIO Y EL TALIO

Átomo	Masa atómica media	Configuración electrónica
Au	196.9665	[Kr] 4d ¹⁰ 4f ¹⁴ 5s ² 5p ⁶ 5d ¹⁰ 6s ¹
Hg	200.59	[Kr] 4d ¹⁰ 4f ¹⁴ 5s ² 5p ⁶ 5d ¹⁰ 6s ²
Tl	204.383	[Kr] 4d ¹⁰ 4f ¹⁴ 5s ² 5p ⁶ 5d ¹⁰ 6s ² 6p ¹

electrón p, más alejado del núcleo que los s, es bastante reactivo comparado con los electrones 6s y, por lo tanto, los enlaces metálicos del talio serán también más fuertes que los del mercurio, obteniendo así unos resultados similares a los del oro [8].

3. APLICACIONES

Una de las primeras aplicaciones del mercurio fue en la alquimia, y también se conoce que el primer emperador chino le atribuía propiedades medicinales y lo consumía a diario, aunque todo lo que consiguió con ello fue deteriorar su salud física y mental en lugar de mejorarla. Tales creencias se derivaban del hecho de que el mercurio era una sustancia líquida y a la vez metálica, de ahí sus atribuciones mágicas. No obstante, como hoy en día es bien sabido, este elemento no solo carece de propiedades místicas, sino que es altamente nocivo para el ser humano.

A pesar de esto, el mercurio tiene diversas aplicaciones. Por su alta densidad se usa en barómetros y manómetros, y su empleo en termómetros (Figura 5) está muy extendido, gracias a su alto índice de expansión termal, considerablemente constante en un amplio rango de temperaturas. También se emplea en la recuperación del oro de sus minerales [4]. En la industria se usa mercurio como un electrodo líquido en la manufactura de hidróxido sódico y cloro por electrólisis de la salmuera. El mercurio todavía se utiliza en algunos equipos eléctricos, tales como interruptores y rectificadores, y aunque bastante menos, también se sigue empleando para baterías para uso do-



Fig. 5. Termómetro de mercurio

méstico e iluminación fluorescente.

Los compuestos de mercurio también presentan diversos usos, entre los que encontramos el de insecticida, veneno para ratas o desinfectante [9],[11].

3.1. Torricelli y el mercurio

Aunque no podemos considerarlo una aplicación como tal, el uso que Torricelli le dio al mercurio sirvió para la instauración de una nueva unidad de medida de la presión, el milímetro de mercurio o mmHg. Para ello, y aprovechando que la densidad del mercurio era 13,6 ve-

ces superior a la del agua, llenó con mercurio un tubo de un metro de longitud abierto solo por uno de sus extremos y lo invirtió sobre una cubeta que contenía más mercurio. La columna de dicho elemento descendió hasta detenerse a unos 76 cm de altura.

Torricelli concluyó que la columna de mercurio se detenía debido a que la presión atmosférica sobre la superficie del mercurio lograba equilibrar la presión ejercida por su peso, y así fue cómo nació el mmHg, la nueva unidad de medida de la presión, también conocida como Torr. 760 Torr son, así pues, una atmósfera [13].

4. TOXICIDAD

El mercurio, así como la mayoría de sus compuestos, es extremadamente tóxico y debe ser manejado con cuidado, ya que puede provocar tanto envenenamiento crónico como agudo. Este elemento puede absorberse a través de la piel y las membranas mucosas, y los vapores de mercurio pueden ser inhalados con mucha facilidad.

Las formas más tóxicas del mercurio son sus compuestos orgánicos, como el dimetilmercurio y el metilmercurio, aunque sus compuestos inorgánicos, como el cinabrio, también son altamente tóxicas si se ingieren o se inhalan.

Los efectos del mercurio en los humanos son muchos y diversos, pero de entre todos cabe destacar, por ejemplo, la alteración del sistema nervioso, daños en las funciones cerebrales, en el ADN y daño cromosómico, reacciones alérgicas, dando lugar a erupciones en la piel, y efectos reproductivos negativos, como daño en el esperma, defectos de nacimiento y abortos involuntarios [10].

4.1. El mercurio y el pescado

El pescado y el marisco tienden a acumular mercurio en sus cuerpos, sobre todo en forma de metilmercurio (uno de los compuestos orgánicos altamente tóxicos antes señalados). Conforme ascendemos en las cadenas tróficas encontramos un incremento del nivel de metilmercurio, por lo que especies de peces que son altos en la cadena alimentaria, como el tiburón, pez espada o atún blanco, contienen cantidades de mercurio que pueden ser hasta diez veces mayores que las de las especies que consumen. Al ser soluble en grasa, se acumula principalmente en las vísceras, aunque también aparecen en el tejido muscular.

Así pues, consumir pescado que contenga altas cantidades de mercurio puede deparar en un envenenamiento, que se conoce con el nombre de Enfermedad de Minamata [10].

4.2. Enfermedad de Minamata

La enfermedad de Minamata es una enfermedad causada por el envenenamiento severo por mercurio que afecta sobre todo al cerebro y al sistema nervioso. Los síntomas incluyen ataxia, entumecimiento en manos y pies o los daños a la audición y el habla. En casos extremos causan

también parálisis y demencia, y el coma y la muerte llegan a las pocas semanas del inicio de los síntomas. Esta enfermedad, además, puede afectar al feto de padecerlo una mujer embarazada.

Esta enfermedad fue descubierta por primera vez en la ciudad de Minamata, Japón, en 1956. Fue causada por la



Fig. 5. Persona con Minamata

liberación de metilmercurio en el agua residual de la fábrica química *Chisso Corporation*, que se acumuló en el marisco y pescado de la bahía de Minamata y el Mar Shiranui [12].

5. CONCLUSIÓN

A pesar de la mala fama del mercurio, este elemento es muy útil desde el punto de vista industrial. Bajo las condiciones adecuadas y con el cuidado necesario, el mercurio puede dejar de verse como un peligro y así aprovechar sus propiedades tan características que lo convierten en un elemento único.

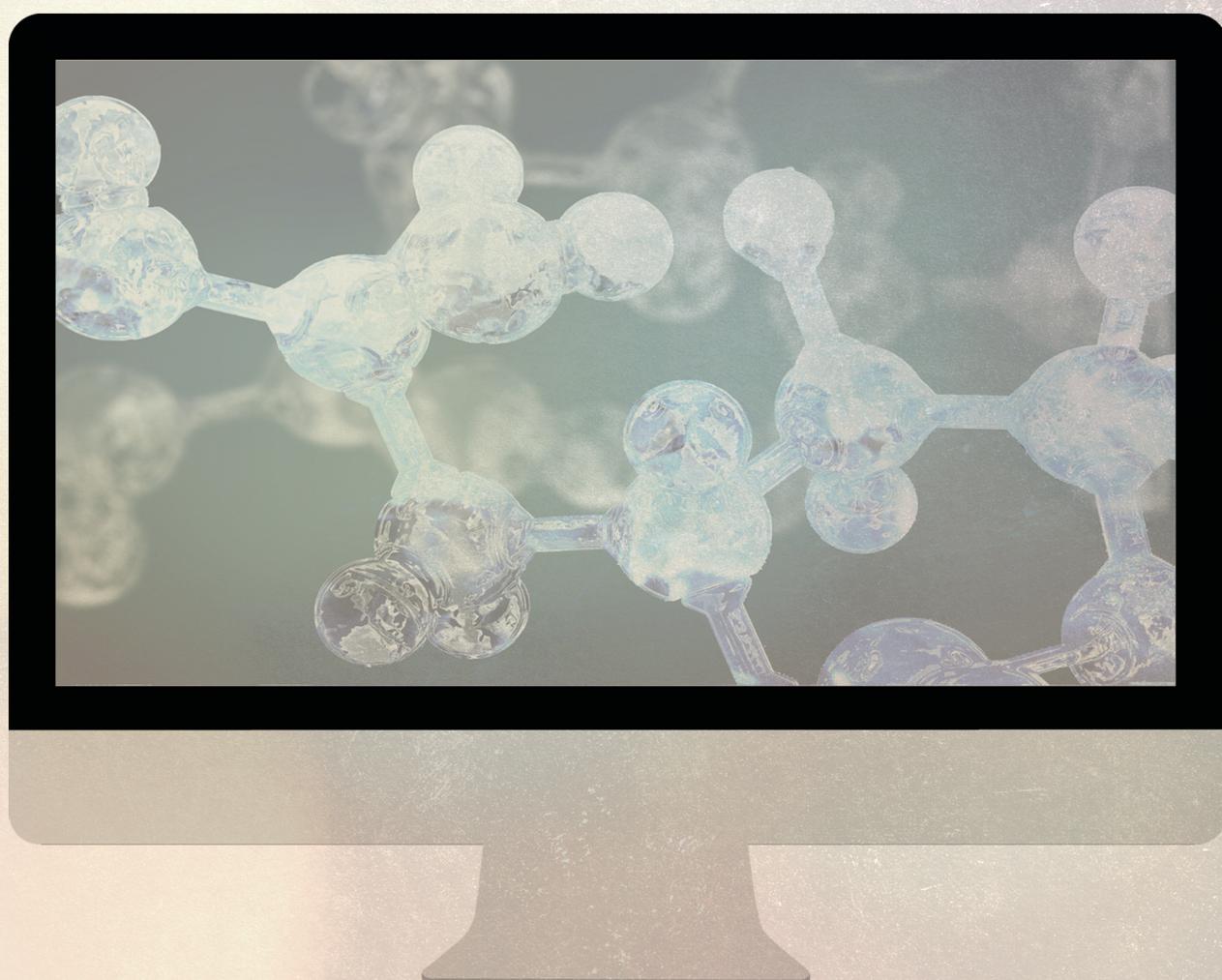
REFERENCIAS

- [1] Hammond, C. R The Elements in Lide, D. R., ed. (2005). CRC "Handbook of Chemistry and Physics," (86th ed.). Boca Raton (FL): CRC Press. ISBN 0-8493-0486-5
- [2] Gmelin, Leopold (1852). "Hand book of chemistry". Cavendish Society. pp. 103 (Na), 110 (W), 122 (Zn), 128 (Fe), 247 (Au), 338 (Pt). Retrieved 30 December 2012.
- [3] www.chemicalelements.com/elements/hg.html (Enlace web)
- [4] www.rsc.org/periodic-table/element/80/mercury(Enlace web)
- [5] www.lenntech.com/periodic/elements/hg.htm (Enlace web)
- [6] Vargel, C.; Jacques, M.; Schmidt, M. P. (2004). Corrosion of Aluminium. Elsevier. p. 158. ISBN 9780080444956.
- [7] Surmann, P; Zeyat, H (Nov 2005). "Voltammetric analysis using a self-renewable non-mercury electrode.". Analytical and Bio-analytical Chemistry 383 (6): 1009-13. doi:10.1007/s00216-005-0069-7. PMID 16228199
- [8] www.antoine.frostburg.edu/chem/senese/101/periodic/faq/why-is-mercury-liquid.shtml (enlace web)
- [9] www.livescience.com/39232-facts-about-mercury.html (Enlace web)
- [10] www.einap.org/envdis/Minamata.html (Enlace web)
- [11] www.mysite.du.edu/~jcalvert/phys/mercury.htm(Enlace web)
- [12] M^aÁngeles Valera Cerdá, "Intoxicación por metilmercurio. La enfermedad de minamata," *MoleQla*, n^o. 9, pp. 122-124, Marzo 2013, ISSN 2173-0903.



Ana Sánchez Molina estudiante de primer año del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide, curso 2013-2014.

BIOINFORMÁTICA



Maximizar el uso de la información disponible en KEGG

Juan Humanes Ferrer

Resumen—En este artículo se va a exponer una aproximación para la explotación de la información pública de KEGG sobre las rutas metabólicas. Para ello se usará la API suministrada por los autores de KEGG.

Palabras Clave—API, Gen, KEGG, KGML, Pathway

1. INTRODUCCIÓN

KEGG es una colección de bases de datos que almacena las funciones y utilidades de los sistemas biológicos, como las células. Una de las bases de datos que forman parte de KEGG es Pathway KEGG[1], registra las redes de interacciones y relaciones moleculares mediante diagramas. Cada mapa está dibujado con un software que genera archivos KGML[2].

Mayo, 2013

KEGG ofrece una API. Es una interfaz de búsqueda de rutas metabólicas. Desde 2012, el servicio basado en REST se sustituyó por otro basado en SOAP. Contiene la mayor parte de las capacidades del servicio anterior y proporciona funciones adicionales para manejar sistemáticamente los identificadores. El problema, es que ahora su acceso es privado.

forman parte de las rutas metabólicas. El elemento de ruta específica un objeto gráfico con los elementos de entrada como sus nodos y la relación y los elementos de reacción como los bordes. La relación y elementos de reacción indican los patrones de conexión de rectángulos (productos de genes) y los patrones de conexión de los círculos (compuestos químicos), respectivamente.

Hay dos tipos de objetos gráficos. Los elementos de entrada y de relación, que forman las redes de proteínas; y los elementos de entrada y de reacción, que forman las redes químicas.

Una ruta puede ser vista como una red de proteínas (enzimas) y como una red de compuestos químicos. En KEGG distingue dos tipos de rutas. Rutas metabólicas vistas como redes de proteínas y redes químicas o rutas de regulación vistas sólo como redes de proteínas.

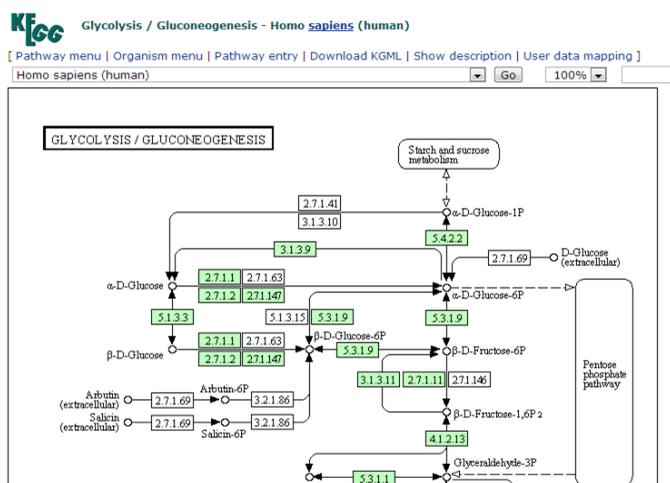


Figura 1. Parte de un mapa de rutas de la glucólisis y la gluconeogénesis en los humanos.

KGML es un formato de etiquetas basado en XML. Estos contienen información sobre los elementos que

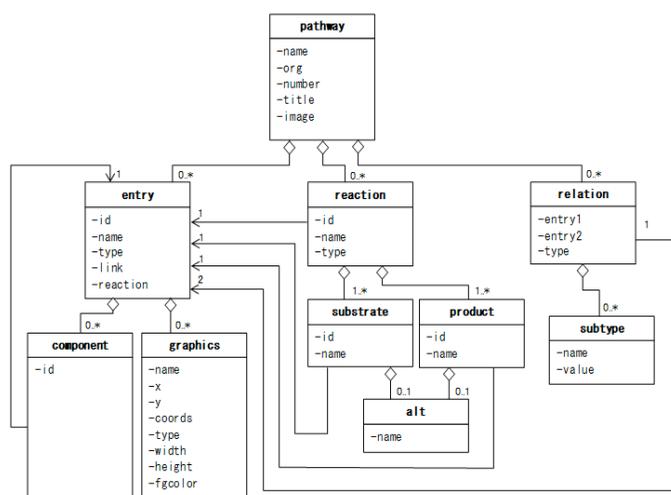


Figura 2. Entidades modeladas por el archivo KGML

En la figura 2 se muestra el modelado de un

archivo KGML a través de etiquetas XML. El nombre de las etiquetas, así como sus atributos se muestran en la figura 3. En cada uno de ellos hay una ruta metabólica que se corresponde con la etiqueta Pathway. Cada Pathway posee un listado de nodos, que se representan con la etiqueta Entry, de reacciones, que corresponde a la etiqueta reaction y de relaciones, llamadas reaction.

Cada nodo de entrada, puede ser de distintos tipos (gen, proteína, etc) y tiene un nombre asociado, esto se guarda mediante los atributos de la etiqueta Entry. Cada nodo, a su vez, tiene una serie de atributos que representan su ubicación en la ruta, esto se guarda en la etiqueta graphics. En las relaciones, se guarda información de los dos nodos de entrada relacionados a través de los atributos entry1 y entry2 y el tipo (gen, gen-proteína, etc..) con el atributo type.

2. PROPUESTA DE PROCESO

Una posible solución, para evitar el acceso privado y maximizar el acceso a la información disponible, es utilizar los archivos KGML que ofrece KEGG en su página web, ya que existe un listado de rutas metabólicas de cada organismo. En estos archivos, se puede extraer que genes están involucrados.

El proceso consiste en la descarga en local y parseo de archivos KGML de un organismo determinado y su posterior parseo para generar la lista de genes que están involucrados en cada ruta metabólica se va a realizar a través de una aplicación JAVA, KeggAccess.

Se compone de tres pasos principales. En primer lugar, la descarga en local de la lista de Pathways de un organismo determinado. A continuación, la descarga en local de archivos KGML y finalmente, el parseo de archivos KGML. El funcionamiento de cada uno de estos pasos se describe a continuación:

2.1. Descarga en local de la lista de Pathways de un organismo determinado

El primer paso es elegir el organismo del que se quiere extraer la información, siendo éste el único argumento que se pasa como entrada a la aplicación. Una vez conocido el organismo, el siguiente paso es extraer todos los pathways del organismo.

KEGG ofrece por cada organismo una lista con cada uno de los pathways en los que actúan genes de dicho organismo. La lista de pathways aparece en la siguiente dirección: <http://rest.kegg.jp/list/pathway/aliasDelOrganismo>. Por ejemplo, para la levadura <http://rest.kegg.jp/list/pathway/sce>. Es decir, a partir del alias del organismo se puede acceder a

cada uno de los pathways.

Esta dirección es un fichero txt, el cual se descarga gracias a la librería java.net.URL, que permite descargar en local un fichero a partir de la dirección como argumento de entrada. El resultado final será un fichero .txt con la lista de pathways del organismo especificado.

2.2. Descarga en local de archivos KGML

El siguiente paso es guardar en local un archivo KGML por cada ruta metabólica del organismo especificado. Estos archivos KGML se encuentran disponibles en la web de Kegg. Siguen este patrón para la dirección: <http://rest.kegg.jp/get/identificadorPathway/kgml>, donde `identificadorPathway` es precisamente el nombre de los Pathways que he guardado anteriormente en un fichero.

Por tanto, se usaría de nuevo librería java.net.URL, para descargar cada uno de los archivos KGML a partir del fichero de la lista de Pathways. Dicho fichero se transforma en una lista, mediante la librería java.IO.File y por cada elemento de la lista, descargo un KGML.

Como mejora al proceso, en caso de que los archivos KGML de un organismo determinado ya se encuentren en local, su descarga no es necesaria y por tanto, los pasos 1 y 2 de este proceso no se realizan y se pasa directamente al siguiente paso, el parseo. Esto se realiza gracias al manejo de carpetas, que ofrece la librería java.IO.File.

```
<?xml version="1.0"?>
<!DOCTYPE pathway SYSTEM "http://www.kegg.jp/kegg/xml/KGML_v0.7.1.dtd">
<!-- Creation date: May 31, 2012 14:53:24 +0900 (GMT+09:00) -->
<pathway name="path:sce00010" org="sce" number="00010"
  title="Glycolysis / Gluconeogenesis"
  image="http://www.kegg.jp/kegg/pathway/sce/sce00010.png"
  link="http://www.kegg.jp/dbget-bin/show_pathway?sce00010">
  <entry id="13" name="sce:YKL060C" type="gene" reaction="rn:R01070"
    link="http://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?sce:YKL060C">
    <graphics name="FBA1, LOT1" fgcolor="#000000" bgcolor="#BFFF8F"
      type="rectangle" x="483" y="404" width="46" height="17"/>
  </entry>
  <entry id="37" name="sce:YER073W sce:YOR374W sce:YPL061W" type="gene" reaction="rn:R00710"
    link="http://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?sce:YER073W+sce:YOR374W+sce:YPL061W">
    <graphics name="ALD5..." fgcolor="#000000" bgcolor="#BFFF8F"
      type="rectangle" x="289" y="943" width="46" height="17"/>
  </entry>
  <entry id="38" name="ko:K01905" type="ortholog" reaction="rn:R00229"
    link="http://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?K01905">
    <graphics name="K01905" fgcolor="#000000" bgcolor="#BFFF8F"
      type="rectangle" x="146" y="911" width="46" height="17"/>
  </entry>
  <entry id="39" name="sce:YMR169C sce:YMR170C" type="gene" reaction="rn:R00711"
    link="http://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?sce:YMR169C+sce:YMR170C">
    <graphics name="ALD3..." fgcolor="#000000" bgcolor="#BFFF8F"
      type="rectangle" x="289" y="964" width="46" height="17"/>
  </entry>
</pathway>
```

Figura 3. Aspecto de un archivo KGML

2.3. Parseo de archivos KGMLs

El último paso sería utilizar los archivos KGML para extraer la lista de Genes involucrados. Para ello realizo un parseo, ya que un KGML es un fichero

XML con etiquetas definidas por KEGG. El parseo se realiza gracias a la librería `java.doc.parsers[3]`. Un archivo XML contiene etiquetas con un nombre específico y dentro de ellas atributos con valores. A través del parseo se recoje la información de las etiquetas en objetos de clases java.

El parseo de los archivos KGML extrae información de las etiquetas Pathway y Entry. De las etiquetas Pathway permite extraer el nombre de la ruta metabólica a través del atributo Title. Esto se guarda en objetos de clase Pathway. Por otro lado, las etiquetas Entry se corresponden con los nodos de entrada, que pueden ser de varios tipos. A través del atributo type puedo conocer que tipo es. Si es de tipo gene, extraemos los genes gracias al atributo name. Esto se guarda en objetos de tipo Entry y se guarda en la lista de Entradas del Pathway al que pertenezca.

3. EJEMPLO DE USO

Un ejemplo de uso para la aplicación es generar un fichero de genes involucrados por cada ruta metabólica. Para ello se llama a el método `listaGenes`, que devuelve el fichero con la lista de genes, una vez por cada Pathway y se le pasa como argumentos el nombre del organismo, el Pathway y su lista de Genes. Utilizo de nuevo la librería `java.File` para generar y escribir en un fichero cada uno de los genes. Dicho fichero se guardará en una carpeta con el nombre del organismo y el fichero tendrá el nombre de la ruta metabólica.

La aplicación se ha probado con el organismo "Saccharomyces cerevisiae"(sce). Se han descargado desde KEGG Pathway un total de 102 archivos KGML. Esto significa que en la Base de Datos se recojen un total de 102 rutas metabólicas relacionadas con este organismo. Por cada KGML se almacena un fichero en local con el mismo nombre de la ruta metabólica. Cada fichero contendrá los genes involucrados en la ruta analizada. Por ejemplo, para el ABC Transporter aparece la siguiente lista de genes: YMR301C, YKL209C, YOR153W, YDR011W, YKL188C y YPL147W.

El proceso total, desde la elección del organismo, generación del fichero de lista de Pathways, descarga y parseo de archivos KGML, y generación los ficheros de genes por cada ruta Metabólica tiene una duración total de 1 minuto y 56 segundos. El tiempo de ejecución es variable en función de la complejidad del organismo

4. CONCLUSIONES

En este artículo se ha propuesto una solución para maximizar la utilidad de consulta pública de

KEGG. Se trata de una aplicación de sencillo acceso a KEGG. Como ejemplo, se usa para conseguir una lista de genes asociados a una ruta metabólica y un organismo. Este fichero puede ser utilizado como entrada de datos a un algoritmo de clustering como por ejemplo, GO-Means.

5. AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos al profesor Doctor Norberto Díaz-Díaz, por guiarme en la propuesta y realización de la aplicación.

REFERENCIAS

- [1] Ogata,H., Goto,S., Fujibuchi,W. and Kanehisa,M (1998) Computation with the KEGG pathway database. Kyoto University.
- [2] Klukas,C. and Schreiber,F (2007) Dynamic exploration and editing of KEGG pathway diagrams. Leibniz Institute.
- [3] Goei,E. (2000) Java and XML Parsing Using Standard APIs. Sun Microsystems.



Juan Humanes Ferrer estudiante de tercer curso de Grado en Ingeniería Informática de Sistemas de Información en la Universidad Pablo de Olavide, residente en Pedrera, Sevilla.

GO-Means: Agrupación de genes basado en medidas de similitud semánticas

Rafael Antonio Rastrero Prieto

Resumen—En este artículo se va a exponer una nueva técnica de clustering, llamada GO-Means. Esta técnica va a agrupar un alto número de genes que estén relacionados, y para ello se medirá la relación entre los diferentes genes mediante una medida de similitud semántica. Para saber si un gen va a pertenecer a un cluster utilizaremos la medida de similitud semántica de GFD desarrollada por Norberto Díaz Díaz [1].

Palabras Clave—Cluster, GFD, similitud, genes.



1. INTRODUCCIÓN

Un problema que aparece asociado a algunas técnicas de Minería de Datos es su falta de comprensibilidad. Este es un problema que afecta a las técnicas basadas en distancia, tanto para tareas de agrupamiento así como de clasificación. Aunque varias de estas técnicas han demostrado ser útiles en la práctica al ofrecer buenas predicciones, no brindan una descripción, patrón o generalización que justifica que el porqué de la decisión tomada para cada individuo. Así, por ejemplo, si bien es de mucha utilidad conocer que una cierto gen pertenece a un grupo porque se encuentra cercano a los otros elementos del grupo de acuerdo a una cierta distancia, es de mayor utilidad poder conocer. La fuente del problema es la dicotomía existente entre las distancias y las generalizaciones [2].

Es bien conocido que las distancias y las generalizaciones dan lugar a dos aproximaciones diferentes en la Minería de Datos y el Aprendizaje Automático. Por un lado, nos encontramos con las técnicas basadas en distancias en donde lo único que necesitamos es contar con una función de distancia o medida de similitud para poder trabajar con ellas. Sin embargo, aunque estas técnicas nos ofrecen esta flexibilidad, no nos proveen patrones o explicaciones que justifiquen las decisiones tomadas. Esto significa que para un conjunto de ejemplos y una generalización de los mismos, se espera que aquellos ejemplos que se encuentren cercanos en un espacio métrico de acuerdo a su distancia sean cubiertos por la generalización, mientras que aquellos que estén lejos se espera que se encuentren fuera de la cobertura de la generalización. Con el fin de sobrellevar este problema, se propone un nuevo algoritmo que integra el agrupamiento basado en la similitud semántica. De esta forma, los nuevos grupos obtenidos permiten mostrar claramente

cuando un elemento ha sido integrado a un grupo porque se encuentra altamente relacionado con los otros elementos del grupo.

Junio, 2013

2. METODOLOGÍA

En este apartado se va a describir el funcionamiento de esta técnica. Se aclararán unos conceptos para entender mejor la técnica y luego se explicará los diferentes pasos que se han llevado a cabo.

2.1. Conceptos Previos

Un algoritmo de clustering es un procedimiento de agrupación de una serie de vectores de acuerdo con un criterio. Esos criterios son por lo general distancia o similitud. La cercanía se define en términos de una determinada función de distancia, como la euclídea, aunque existen otras más robustas o que permiten extenderla a variables discretas.

- La similitud semántica es calculada mediante GFD, esto es una característica importante ya que GFD ha sido comparado con otras técnicas similares y por los estudios realizados a demostrado ser el mejor, por eso hemos decidido utilizarlo. La medidas de similitud cuantifican el nivel de parecido de dos objetos.

Una de las características más importantes de GO-Means es que el número de cluster no tenemos que introducirlo, sino que nuestro algoritmo los va a calcular automáticamente. Por lo que esto es una gran diferencia con respecto a otras técnicas como es K-MEANS, en el cual una elección inapropiada puede acarrear malos resultados.

A continuación se va a describir el funcionamiento de GO-Means con la ayuda del pseudocódigo. El algoritmo presentado en este artículo puede ser dividido en cuatro pasos.

Algorithm 1 Matriz Pertenencia

INPUT L : Lista Genes
OUTPUT MP : Matriz de Pertenencia
begin
 while $comprobarCambios(MP) == TRUE$ do
 $MP = calcularMatrizPertenencia(L)$
 end while
 $C = construirCluster(MP, L)$
 $LC = crearListaCluster(MP)$
end

2.2. Comprobar cambios en la Matriz de Pertenencia

En el primer paso es comprobar la matriz de pertenencia hasta que los valores que ésta contiene no sufran ningún cambio debido a la actualización de la matriz mediante los valores de los genes.

2.3. Calcular Matriz de Pertenencia

En este segundo paso lo que se hace es rellenar la matriz de pertenencia. La matriz de pertenencia contiene los valores que calculamos mediante la similitud semántica GFD. La forma de calcular dicho valor es mediante la siguiente fórmula:

$$Dist = GFD(C - g) - GFD(C + g) \quad (1)$$

, donde GFD es la llamada a un método de GFD, C es un cluster y g es un gen. Esta aproximación, GFD, extrapola esta medida de disimilitud para evaluar la homogeneidad de conjuntos de genes. Cuando GFD compara dos genes devuelve un valor entre 0 1, cero significa que los genes están altamente relacionados y uno significa que los genes no están relacionados en absoluto. El sentido de esta ecuación es medir la idoneidad de un gen con un cluster. La idoneidad se mide mediante el valor devuelto ($Dist$) por la ecuación el cual está en un rango de 0 1, donde 1 es lo mejor, es decir, el gen debe estar en el cluster y 0 lo peor, el gen no debe estar en el cluster, para ello en primer lugar se calcula el valor de GFD eliminando al gen X del cluster Y (si el gen X está en el cluster Y), en segundo lugar se calcula el valor de GFD añadiendo el gen X al cluster Y (si el gen X no está en el cluster Y), y por último se resta estos dos valores, respectivamente. Una vez se obtiene este resultado se introduce en la matriz de pertenencia en la posición que corresponda.

2.4. Construir Cluster

Una vez obtenida la matriz de pertenencia lo siguiente es formar los cluster. La formación de los cluster se va a basar en los valores de la matriz de pertenencia. Inicialmente se supone que todos los genes están en un sólo cluster. A continuación, se va recorriendo la matriz de pertenencia y se van comprobando los valores de ésta.

Algorithm 2 Conjunto de Cluster

INPUT L : Lista Genes
OUTPUT S : Conjunto de clusters
begin
 for $i = 0$ hasta $i \leq MP.size$ do
 for $j = 0$ hasta $j \leq MP[i].size$ do
 $v = MP[i][j]$
 if $v == 0$ and $esUsado(v) == FALSE$ then
 actualizaFilaX
 actualizaFilaY
 $i = 0$ and $j = 0$
 end if
 $j = j + 1$
 end for
 $i = i + 1$
 end for
end

Se va recorriendo la matriz y se va comprobando lo siguiente:

1. Si el valor es negativo y no ha sido usado (que el gen esté usado significa que ya se ha tratado antes):
 - a) Se tiene que eliminar el gen de la fila donde su valor es negativo y actualizar esa fila ya que ahora hay un gen menos.
 - b) Se tiene que añadir el gen en una nueva fila y actualizar esta nueva fila.
 - c) Se vuelve a comenzar el recorrido ya que han cambiado los valores.

2.5. Contruir Lista de Cluster

En este último paso lo que se hace es coger la matriz de pertenencia actualizada se recorre por columnas (genes) y se calcula el máximo de la columna. Este máximo indica en que cluster debe de estar un gen. Por lo que al finalizar este paso se obtendrá una lista de cluster, en la que cada posición de esta lista contendrá un cluster compuesto de genes.

3. EXPERIMENTACIÓN

La experimentación realizada se ha hecho utilizando tres rutas metabólicas (ABC-transporter, Homeostasis, RNA-Polimerase). Se van a exponer los resultados obtenidos con las tres rutas metabólicas. También se ha utilizado como ayuda una herramienta, la cuál sirve para representación de genes, con la que se ha podido comprobar que los cluster que genera GO-MEANS son correctos. A continuación se va a exponer los tres resultados obtenidos con las tres rutas metabólicas y se describirá una de ellas en detalle, en concreto la ruta metabólica RNA-Polimerase.

3.1. ABC-transporter

A continuación se muestran también los resultados con la ruta metabólica del ABC-transporter.

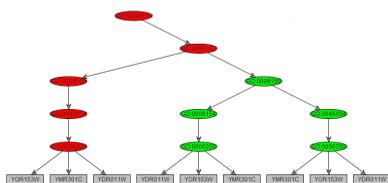


Figura 1. Representacion ABC-transporter

En la figura 1 aparecen los diferentes genes de la ruta metabólica. El color rojo indica que es la ruta que hay que seguir para llegar del gen raíz hasta un gen y/o viceversa que es la que ha elegido GFD, y el color verde indica que es una ruta alternativa. Como se puede observar en la figura los tres genes de la función metabólica se encuentran colgando de un mismo término, esto significa que deberían encontrarse los tres en un mismo cluster. En el resultado de la ejecución de GO-MEANS salió que los tres genes se encontraban en el mismo cluster, como se puede ver en la figura 2, por lo que se puede decir que para esta prueba funcionó correctamente.

Cluster 1
YDR011W
YMR301C
YOR153W

Figura 2. Resultado de GO-MEANS

3.2. RNA-Polimerase

A continuación se muestran también los resultados con la ruta metabólica RNA-Polimerase. Se muestra desde el ancestro común más bajo.

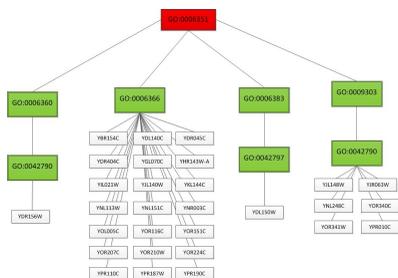


Figura 3. Representación RNA Polimerase

En la figura 3 aparecen los diferentes genes de la ruta metabólica. El color rojo indica que es la ruta que hay que seguir para llegar del gen raíz hasta un gen y/o viceversa que es la que ha elegido GFD, y el color verde indica que es una ruta alternativa. Como se puede observar en la figura 3 se puede diferenciar cuatro grupos, estos cuatro grupos se corresponden con los cuatro cluster que se han obtenido como resultado de la ejecución de GO-Means, como se puede ver en la figura 4. Por lo tanto se puede verificar que el resultado obtenido de GO-Means es

correcto.

Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
GO:0006366	GO:0009303	GO:0006360	GO:0006383
GO:0042790	GO:0042790	GO:0042790	GO:0042797
YBR154C YDL140C YDR045C YDR404C YGL070C YHR143W-A YIL021W YJL140W YKL144C YNL113W YNL151C YNR003C YOL005C YOR116C YOR151C YOR207C YOR210W YOR224C YPR110C YPR187W YPR190C	Y3L148W Y3R063W YNL248C YOR340C YOR541W YPR010C	YDR156W	YDL150W

Figura 4. Resultado de GO-MEANS

4. CONCLUSIONES

El algoritmo propuesto en este documento está diseñado para encontrar grupos de genes que estén altamente relacionados.

Decir que esta metodología que se ha descrito anteriormente es una primera aproximación de GO-Means ya que se está trabajando en una segunda aproximación, la que será aún mejor que la primera, en la que se tendrá en cuenta más objetivos para introducir los genes en los cluster.

5. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer la ayuda de la Universidad Pablo de Olavide y en especial la del Profesor Doctor Norberto Díaz Díaz, coordinador de la asignatura de bioinformática, y compañero por la ayuda prestada en el desarrollo y diseño de esta nueva técnica de clustering. También agradecer a mis padres todo el apoyo recibido.

REFERENCIAS

[1] Norberto Díaz Díaz *Tesis de Norberto Díaz Díaz* ISBN:1202011006432, 2012 <http://www.upo.es/eps/ndiaz/publications.html>

[2] Ana Funes *Agrupamiento Conceptual Jerárquico Basado en Distancias* Tesis de Máster, 2008 <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/13621/tesis.pdf?sequence=1>



Rafael Antonio Rastrero Prieto estudiante de tercero del Grado en Ingeniería Informática de Sistemas de Información en la Universidad Pablo de Olavide, residente en La Roda de Andalucía, Sevilla.

Análisis de Medidas de Similitud Semántica Actuales

Alberto Quero Brunete

Resumen—Se analizarán diversas medidas de similitud semánticas para el estudio del genoma actual existente al igual que para la próxima generación del mismo.

Palabras Clave— anotaciones, Gene Ontology (GO), NGS, secuencia, similitud semántica.

1. INTRODUCCIÓN

Gene Ontology es un trabajo de colaboración, centrado en dirigir descripciones consistentes de gene-products (material bioquímico, ya sea ARN o proteína, resultante de la expresión de un gen) en diferentes bases de datos, para hacer facilitar el trabajo biológico.

Gene Ontology ha desarrollado tres vocabularios controlados y estructurados, llamados ontologías que describen los gene-products en función de sus procesos biológicos (PB), componentes celulares (CC) y funciones moleculares (MF).

Las ontologías están estructuradas como grafos acíclicos dirigidos (DAG), las cuales son similares a las estructuras jerárquicas, con la diferencia de que un término más especializado (hijo) puede estar relacionado con más de un término menos especializado (padre).

En este artículo se van a analizar distintas medidas de similitud basadas en Gene Ontology, para los distintos elementos biológicos del genoma actual, CroGo y la medida de similitud en proteínas complejas.

También se analizara la herramienta Argot2, que es usada para estudiar la similitud de funciones en diferentes secuencias de aminoácidos.

2. MEDIDA DE SIMILITUD CROGO

2.1. Definición

Una de las medidas de similitud que se va a analizar en este artículo es la de Cross Category Gene Ontology (CroGo)[2]. Esta medida es capaz de calcular la similitud entre dos categorías de términos GO (Go-terms) eficientemente, definidos por su función, creando para ello una red de datos. En comparación con otros algoritmos CroGo tiene las siguientes ventajas:

- Incorpora información de las redes de co-función de los genes, la cual es importante para la comprensión entre conceptos biológicos.
- Determina la dirección de los términos relacionados teniendo en cuenta la estructura jerárquica de GO.
- Se evita el problema de 'anotación superficial' en CroGo, teniendo en cuenta que se trabaja con términos muy específicos.
- La red generada por la asociación de términos con CroGO es el genoma específico, el cual los términos conservados puede sugerir conexión de funciones vitales al igual que la asociación de términos en ciertos organismos puede sugerir funciones específicas para el genoma .

2.2. Resumen

En definitiva esta medida de similitud procederá a montar una red a partir de las anotaciones de Gene Ontology (GO). Para ello se cogerán dos términos GO de diferentes ontologías GO y analizando las medidas que a continuación se exponen, si el resultado nos indica que los elementos son similares se introducirán en la nueva red que se va a crear, sino se desecharán.

2.3. Método

Para medir la similitud entre los términos de diferentes categorías de GO, CroGo tiene los siguientes pasos:

- Paso 1: Se calcula la asociación de dos conjuntos de genes 'G1' y 'G2', que son anotados con los términos 't1' y 't2' y que están en las categorías de GO 'C1' y 'C2' respectivamente, para ello se define el GSA (asociación de conjunto de genes), tomando en consideración las aristas que están ponderadas en la red de co-función para el gen N [Imagen 1].

$$GSA(G_1, G_2) = \frac{|G_1UG_2| - |G_1 - G_2| - |G_2 - G_1|}{|G_1UG_2|}$$

Los nodos en la red N representan los genes, y las aristas representan las interacciones funcionales

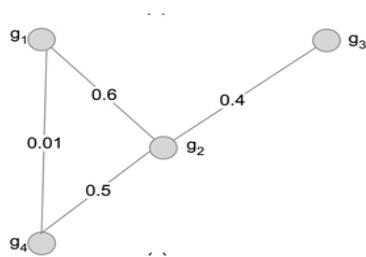


Figura 1. Red N

entre los genes. Cada arista tiene asociada una puntuación que mide la probabilidad de interacción, a mayor es el número, más interacción hay y mayor similitud tienen los genes.

- Paso 2: Dados dos términos GO, 't1' y 't2' de las diferentes categorías de GO 'C1' y 'C2', la 'Sim(t1,t2)' se define de la siguiente forma:

$$Sim(t_1, t_2) = GSA(G_1, G_2) * \sqrt{\left(1 - \frac{|G_1|}{|G_{c1}|}\right) * \left(1 - \frac{|G_2|}{|G_{c2}|}\right)}$$

Donde la primera parte de la función representa la asociación entre el conjunto de genes anotados a los términos 't1' y 't2', y la segunda parte de la función nos indica la especificidad de ambos términos. Si 't1','t2' son similares, se añadirán a la nueva red de co-función creada, sino serán desechados en la nueva red.

3. MEDIDA DE SIMILITUD PARA PROTEÍNAS COMPLEJAS

3.1. Definición

La siguiente medida de similitud se basa en analizar la similitud semántica de las proteínas complejas. Esta medida de similitud será usada para estimar la fiabilidad de las interacciones en las redes Interacción Proteína - Proteína (PPI).

El cálculo de esta medida de similitud medirá la distancia media para el conjunto de pares de términos GO. La similitud semántica entre las proteínas se calcula como la similitud de los dos conjuntos de términos de GO. Las redes PPI están ponderadas según la interacción que se produce en las proteínas, para el posterior filtrado y agrupamiento.

3.2. Resumen

Este método procede a realizar un primer filtrado de aquellas interacciones que tengan menos ponderación, acto seguido se realizará un algoritmo de expansión de cluster para identificar las proteínas que tengan una alta ponderación y que tienen

interacciones fiables.

Se han propuesto muchos algoritmos basados en teoría de grafos, para identificar complejos de proteínas mediante la detección de regiones densas, en áreas PPI tales como MCODE, CL y CFinder, pero su rendimiento se ve afectado por las falsas interacciones en la red.

3.3. Método

En primer lugar se calcula la similitud que hay entre dos términos 'x' e 'y' en una ontología GO. Para ello calcula la distancia media que hay desde 'x' hasta la raíz de la ontología 'd(a,x)' [3], y desde 'y' hasta la raíz 'd(a,y)'.

Se dicen que dos términos 'x' e 'y' son similares si sus distancias a sus ancestros comunes en el DAG son más cortas o si la distancia media a la raíz es más larga. Se define LCA (x,y) como el conjunto de ancestros comunes del término 'x' y del término 'y' :

$$Sim(x, y) = \frac{\sum_{a \in LCA(x,y)} \frac{d(root,a)^2}{d_a(root,z) * d_a(root,y)}}{|LCA(x, y)|}$$

Una vez calculado la similitud que hay entre los dos términos de una ontología, se procede a medir la similitud de dos proteínas distintas. Para ello se buscará para cada término 'x' en 'TA', el término más similar en 'TB' que se calcula como $max_{y \in TB} (sim(x, y))$ y viceversa.

$$PSim(A, B) =$$

$$= \frac{\sum_{x \in TA} max_{y \in TB} (sim(x, y)) + \sum_{x \in TB} max_{y \in TA} (sim(x, y))}{|TA| + |TB|}$$

4. ARGOT 2

4.1. Definición

Argot 2 es una herramienta que posibilita el análisis del genoma completo y no solo de una parte del mismo.

También se encarga de describir genes en proyectos de secuenciación a gran escala. Para ello cuenta con una interfaz web gratuita y completamente funcional. En la era postgenómica en vez de estudiar una parte del genoma, lo que se pretende es estudiar el genoma entero (NGS).

4.2. Resumen

Argot 2 usa la medida de similitud de Lin para poder describir genes a gran escala.

4.3. Método

Argot 2 aplica un sistema de ponderación y se centra en agrupar los términos GO más precisos, anotando las proteínas principales. Toma una lista de los términos GO pertenecientes al grafo de GO 'G(V,E)' como entrada y unos pesos de acuerdo a un 'e-valor'. Argot 2 tiene dos maneras de calcular los pesos, son tanto BLAST como HMMER [?]

La medida de similitud semántica usada para Argot2 viene formulada por Lin. Esta medida fue elegida ya que dió mejor resultado en las anotaciones de agrupamiento con respecto a otras medidas de similitud.

$$sim(g_i, g_j) = \frac{2 * sim_{res}(g_i, g_j)}{IC(g_i) + IC(g_j)}$$

5. CONCLUSIONES

Se concluye, que haciendo uso medidas de similitud, posibilitan el avance en el estudio del genoma completo actualmente, como el estudio del mismo en un futuro, en el terreno de la biología, para poder poner analizar y curar enfermedades que, a día de hoy, son incurables.

6. AGRADECIMIENTOS

Se agradece a todas aquellas personas, en especial a Dr. Norberto Diaz Diaz, que han hecho posible la elaboración y publicación del presente artículo, sin su apoyo, corrección y colaboración estas líneas no hubieran sido posibles.

REFERENCIAS

- [1] Norberto Diaz, 'Similitud Funcional de Genes basada en Conocimiento Biológico', <http://www.upo.es/eps/ndiaz/downloads/ThesisNorbertoDiazDiaz.pdf>
- [2] Jiajie Peng, Jin Chen, and Yadong Wang, 'Identifying cross-category relations in gene ontology and constructing genome-specific term association networks', BMC
- [3] Jian Wang, Dong Xie, Hongfei Lin, Zhihao Yang and Yijia Zhang, Filtering Gene Ontology semantic similarity for identifying protein complexes in large protein interaction networks, BMC Bioinformatics, 2013.
- [4] Marco Falda, Stefano Toppo, Alessandro Pescarolo, Enrico Lavezzo, Barbara Di Camillo, Andrea Facchinetti, Elisa Ci-lia, Riccardo Velasco and Paolo Fontana, Argot2: a large scale function prediction tool relying on semantic similarity of weighted Gene Ontology terms, BMC Bioinformatics, 2013
- [5] Schlicker A, Domingues FS, Rahnenfuhrer J, Lengauer T: A new measure for functional similarity of gene products based on Gene Ontology, 2006.
- [6] Wang JZ, Du ZD, Payattakool R, Yu PS, Chen CF: A new method to measure the semantic similarity of GO terms.
- [7] Bork P, Jensen LJ, von Mering C, Ramani AK, Lee I, Marcotte EM: Protein interaction networks from yeast to human., 2007
- [8] King A, Przulj N, Jurisica I: Protein complex prediction via cost-based clustering., 2004
- [9]
- [10] Leung HC, Yiu SM, Xiang Q, Chin FY: Predicting Protein Complexes from PPI Data: A Core-Attachment Approach, 2009.
- [11] Galperin MY, Koonin EV: From complete genome sequence to 'complete' understanding. 2010

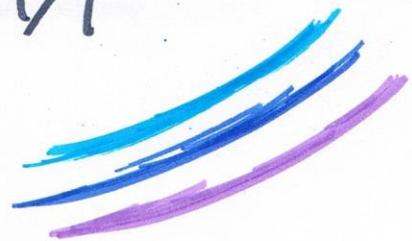


Alberto Quero Brunete actual alumno de Grado en Ingeniería Informática en Sistemas de Información en la universidad Pablo de Olavide, Sevilla. Comenzó sus estudios en esta universidad en el año 2010. Actualmente se encuentra en el tercer curso del grado.



Molekula

Viva



¿Es mejor estar solo o acompañado? Preguntémosle a nuestro sistema inmune

María José Conde Dusmán

Resumen—Sensaciones como la soledad, el aislamiento social, el agobio propio de un periodo de exámenes o las discusiones y conflictos de pareja tienen como punto en común la inducción de un estrés a nuestro organismo. Dicho estrés estimulará múltiples transformaciones en nuestro cuerpo, siendo destacable la alteración de la respuesta inmune celular; esto último tendrá graves consecuencias para el mismo puesto que lo incapacitará para responder ante virus y bacterias.

Palabras Claves— Cortisol, Eje HPA, Estrés, Sistema Inmune, Soledad.



1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se están llevando a cabo numerosos estudios que pretenden dilucidar la conexión existente entre la condición social o el estado anímico de un individuo y el funcionamiento de su sistema inmunológico. Situaciones como la soledad temporal producto de la mudanza a una nueva ciudad o el comienzo de los estudios en un nuevo centro, el estrés agudo propio del periodo de exámenes o el crónico fruto de la ansiedad y las preocupaciones sobre las relaciones personales y laborales, son potenciales detonantes de un incorrecto funcionamiento del sistema inmune que puede llevar al desarrollo de múltiples enfermedades. Cuál es el nexo de unión que desencadena dicha disfuncionalidad es aún a día de hoy ampliamente discutido, pero en la gran mayoría de las publicaciones se habla de una hormona esteroidea, el cortisol, como el principal candidato [1].

En la presente publicación se pretende mostrar de forma somera los hallazgos más recientes en este campo. Para ello, usando como base distintos experimentos, desarrollaré el fundamento hormonal e inmunológico que se esconde detrás de algunas de las circunstancias citadas.

2. EL AISLAMIENTO, LA SOLEDAD Y LAS RELACIONES DE PAREJA “BAJO NUESTRA PIEL”

El aislamiento social se define como aquella condición en la que el individuo tiene pocos contactos con la familia y la comunidad, mientras que la soledad es la sensación o el sentimiento de estar solo. Dichas realidades pueden estar correlacionadas o darse por separado, ya que un sujeto con un gran número de conocidos puede experimentar también la soledad [2].

Desde los años ochenta del pasado siglo se han realizado múltiples estudios con los que se pretendía relacionar ambos estados con ciertas patologías como los problemas de salud mental o el incremento del riesgo de suicidio y del declive funcional. En todas estas investigaciones se concluyó que el aislamiento social y la soledad estaban asociados con una peor salud, mientras que aquellos individuos que dedicaban una mayor proporción de su

tiempo para actividades de carácter social presentaban índices de riesgo de mortalidad o de desarrollar enfermedades menores. Centrándonos en el empeoramiento del funcionamiento del sistema inmune, destacan aquellos experimentos que relacionaron la soledad con una función disminuida de las células *natural killer* (células NK) o con un incremento de los niveles de anticuerpo frente al virus del Epstein-Barr (lo que sugería un menor control inmune sobre el patógeno). Pero en ningún caso se pudo determinar cómo la soledad provocaba este anormal funcionamiento [2].

En el año 2005 se llevó a cabo un estudio en la Universidad Carnegie Mellon (Pittsburgh, EE.UU.) en el que se compararon los efectos del aislamiento social y la soledad sobre la función inmune. Para ello, usaron una cohorte de un total de 83 estudiantes de primer año de entre 18 y 25 años que no habían sido previamente vacunados para el virus de la gripe (se seleccionaron alumnos de primer año porque había sido descrito que esta época suele venir emparejada con una sensación de soledad). El experimento comenzó con la inmunización de los estudiantes mediante dicha vacuna. Después, durante cuatro meses controlaron: el nivel de producción de anticuerpos producidos como respuesta a dicha vacuna, el grado de soledad y aislamiento al que estaba sometido el sujeto (mediante un diario que comenzaron dos días antes de la vacunación) y los niveles de cortisol en la saliva (de lo cual sólo se hicieron cinco medidas siendo una de ellas el día antes de la inmunización). Aunque nos pueda parecer extraña esta última medida, el cortisol es un glucocorticoide producido mayoritariamente ante una situación de estrés, la cual puede tornarse crónica en los individuos que se encuentran solos o aislados socialmente. Por tanto, una posible vía que indujera el incorrecto funcionamiento inmunitario en los escenarios mencionados podría ser mediada por hormonas como el cortisol, de hecho, se ha demostrado que esta hormona esteroidea se sobre-produce en estudiantes con soledad crónica. Sin embargo, aunque los autores pudieron demostrar la relación existente entre la soledad y el aislamiento social con la disminución de la producción de anticuerpos ante la vacuna (en la Figura 1 se muestra únicamente el gráfico referente a los paráme-

tros de soledad) fueron incapaces de llevar esta relación a la variación del cortisol en la muestra de saliva. Una posible causa que se plantean es que, al haber obviado pará-

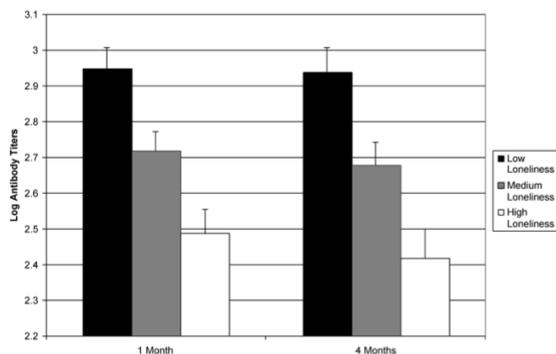


Fig. 1. Niveles de anticuerpo medidos a uno y cuatro meses desde la inmunización (dicho día fue tomado como base). La soledad fue analizada como una variable continua. Las barras de error representan el error estándar de la media [2].

metros accesorios como el cambio de los hábitos de sueño, las medidas de cortisol se volvían irregulares en el tiempo [2].

Pero igual que se ha demostrado que la soledad disminuye la generación de anticuerpos por parte de las células plasmáticas, también se ha discutido cómo afectan las relaciones de pareja al sistema inmune [3]. En un estudio, se midieron los niveles de cortisol en saliva de 124 parejas jóvenes durante una discusión sobre un conflicto no resuelto, antes y después de la discusión. En función de la forma con la que mujer y hombre mantienen su vínculo de pareja, podemos hablar de distintos tipos de apego. En el ensayo se vio que aquellas mujeres con un apego o vínculo con un alto grado de evitación mostraban mayores niveles de reactividad del cortisol durante la discusión que las que presentaban un apego seguro o de menor evitación y, además, recuperaban rápidamente los niveles basales al finalizar la misma (Figura 2a). Por otro lado, cuando se analizaron los niveles de reactividad del cortisol en sus parejas masculinas se vio que su reactividad durante la discusión era superior cuando presentaban un mayor nivel de ansiedad en la relación y se recuperaba el nivel basal a menor velocidad (Figura 2b). Sin embargo, los niveles de reactividad del cortisol disminuían y se recuperaba más rápido el nivel basal en el hombre cuando su pareja presentaba un apego de tipo seguro [4].

En un ensayo posterior se llegó incluso a relacionar el estrés marital durante un conflicto con la desregulación inmune, lo que llevaba concretamente a un aumento de la producción de interleucina-6 (IL-6). Se analizó para ello la producción de dicha citoquina en una cohorte de 35 parejas durante dos sesiones: una control en la que se les dio apoyo social y una segunda sesión en la que enfrentaron un conflicto. Ante estas situaciones se obtuvo se concluyó que aquellos individuos con un tipo de apego caracterizado por un alto grado de evitación presentaban un aumento promedio del 11% en la producción total de IL-6 durante el conflicto con respecto a la sesión control; y, por otro lado, los individuos con un apego de evitación inferior tuvieron, en promedio, una disminución del 6% en la

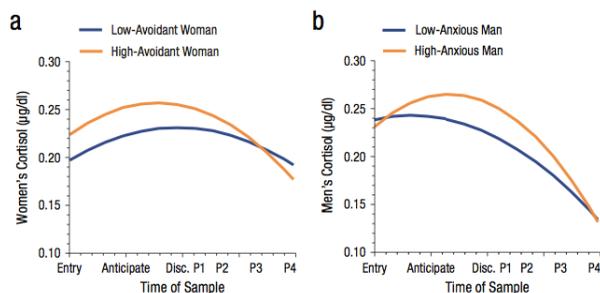


Fig. 2. Reactividad del cortisol y trayectoria de recuperación en mujeres cuya vinculación a su pareja presenta una baja o elevada evitación (a) y en hombres con un bajo y alto grado de ansiedad en su vínculo de pareja (b). Los niveles de cortisol se midieron a siete tiempos: antes de entrar al laboratorio (Entry), cuando se estaba gestando la discusión con su pareja (Anticipate), durante la discusión (Disc.), justo después de la discusión (P1), 15 minutos después de la discusión (P2), 30 minutos después de la discusión (P3) y 45 minutos después de la discusión (P4) [4].

producción de IL-6 durante la visita conflicto en comparación con el control. En resumen, estos resultados sugieren que en un matrimonio en el que uno o ambos cónyuges presentan un apego de evitación, dicho tipo de vínculo va a modular el comportamiento marital y el nivel de estrés, lo que a su vez inducirá la alteración de la producción de citoquinas [5].

En definitiva, en todos los ensayos se relacionan la soledad, el aislamiento social o las discusiones de pareja como desencadenantes de una situación de estrés que llevaría a la producción de cortisol y, en consecuencia, a la desregulación del sistema inmune.

3. EL EJE HIPOTALÁMICO PITUITARIO ADRENAL (HPA) ANTE LAS SITUACIONES DE ESTRÉS: EL CORTISOL Y EL SISTEMA INMUNE

Como ya he mencionado, la exposición a situaciones de estrés crónico puede triplicar e incluso cuadruplicar las posibilidades de desarrollar enfermedades debido, entre otros motivos, al incorrecto funcionamiento de nuestro sistema inmune. Entre los distintos mecanismos biológicos que podrían estar implicados en este fenómeno, es el mediado por el eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA) el más estudiado y defendido [6].

El eje HPA es una parte fundamental del sistema neuroendocrino presente en un amplio abanico de organismos (desde las aves hasta los propios humanos) y encargado tanto del control de la reacciones al estrés como de la regulación de diversos procesos entre los que se incluyen las emociones, la conducta sexual y el sistema inmune. En cualquier caso, la activación de dicho eje se produce cuando, ante una señal de estrés o de bajo nivel de glucocorticoides en sangre, las neuronas neuroendocrinas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan vasopresina y hormona liberadora de corticotropinas (CRH) o corticoliberina. Dichas hormonas llegan a la glándula pituitaria provocando la secreción de un pulso de corticotropina u hormona adrenocorticotropa (ACTH), que a su vez actuará sobre la zona *fasciculata* del córtex adrenal

para inducir la producción de glucocorticoides entre los que destaca el cortisol [6].

El cortisol juega un papel central en el sistema nervioso central, donde está involucrado en procesos de aprendizaje y memoria; en el metabólico, donde regula el almacenamiento de glucosa y su utilización; y en el inmune, donde regula la magnitud y duración de la respuesta inflamatoria y la maduración de los linfocitos. Una situación de estrés crónico o agudo podría conducir a la desregulación del eje HPA incrementado la producción de cortisol, el cual puede debilitar el sistema inmune al evitar la proliferación de los linfocitos T, es decir, disminuir la inmunidad celular. Para alcanzar este fin, el cortisol impide a los linfocitos T producir IL-2 al insensibilizarlos frente al efecto activador de la IL-1 lo que a su vez impide que dicha citoquina actúe como factor de crecimiento. Así mismo, el cortisol antagoniza la función de la IL-1 que, entre otras funciones, promueve la apoptosis de ciertos patógenos así como la respuesta inflamatoria y la fiebre [6]. Por tanto, podemos concluir que la inhibición de la respuesta inmune por parte del cortisol ante situaciones de estrés conllevaría un incremento de la susceptibilidad a padecer enfermedades de carácter infeccioso [6,7].

4. CONCLUSIONES

Tal y como se ha desarrollado en el presente trabajo, escenarios como el sentimiento de soledad, el aislamiento social o relaciones de pareja plagadas de discusiones inducen el desarrollo de una situación de estrés que podría convertirse en crónico de mantenerse constante en el tiempo. Dicho estrés produce una respuesta hormonal excesiva en nuestro organismo a través del eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA), lo que tendrá como resultado la desregulación del sistema inmune y al consecuente aumento de la susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas.

Aunque son muchos los estudios realizados en este campo, ninguno de ellos se centra en estudiar cómo varían las distintas hormonas del eje HPA o si la alteración del cortisol encontrada produce en todas las situaciones mencionadas la misma desregulación del sistema inmune. Por tanto, sería interesante que en futuros estudios se profundizara en estos aspectos.

REFERENCIAS

- [1] Web de la Universidad de Ohio. <http://researchnews.osu.edu/archive/lonely.htm>
- [2] Sarah D. Pressman, Sheldon Cohen, Anita Barkin, Gregory E. Miller, Bruce S. Rabin and John J. Treanor "Loneliness, Social Network Size, and Immune Response to Influenza Vaccination in College Freshmen" *Health Psychology*, vol. 24, no. 3, pp. 297-306 2005, doi: 10.1037/0278-6133.24.3.297.
- [3] Web de la Universidad de Ohio. <http://researchnews.osu.edu/archive/attachanx.htm>
- [4] Paula R. Pietromonaco, Casey J. DeBuse and Sally I. Powers, "Does Attachment Get Under the Skin? Adult Romantic Attachment and Cortisol Responses to Stress" *Current Directions in Psychological Science*, vol. 22, no. 1, pp. 63-68, 2013, doi: 10.1177/0963721412463229.
- [5] Jean-Philippe Guoin, Ronald Glaser, Timothy J. Loving, William B. Malarkey, Jeffrey Stowell, Carrie Houts and Janice K. Kiecolt-Glase, "Attachment avoidance predicts inflammatory responses to marital conflict" *Brain, Behavior and Immunity*, vol. 23, no. 7, pp. 898-904, 2009, doi: 10.1016/j.bbi.2008.09.016.
- [6] Gregory E. Miller, Edith Chen and Eric S. Zhou, "If It Goes Up, Must It Come Down? Chronic Stress and the Hypothalamic - Pituitary -Adrenocortical Axis in Humans" *Psychological Bulletin*, vol. 133, no. 1, pp. 25-45, 2007, doi: 10.1037/0033-2909.133.1.25.
- [7] Robert M. Sapolsky, L. Michael Romero and Allan U. Munck, "How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions" *Endocrine Reviews*, vol. 21, no. 1, pp. 55-89, 2000.



María José Conde Dusmán es estudiante de último curso de la Licenciatura en Biotecnología por la Universidad Pablo de Olavide (promoción 2008-2013). Desde 2010 es alumna interna del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, donde ha trabajado con los Drs. Carlos Santos Ocaña y Claudio Asencio Salcedo. Actualmente es Vicepresidenta de la Asociación Biotecnólogos de Andalucía (AsBA) y Coordinadora

General del Biotech Annual Congress que se celebrará el próximo mes de Julio en Sevilla.

Las semaforinas

Paula Callejo García

Resumen—Las semaforinas fueron identificadas por primera vez en el sistema nervioso, involucradas en el desarrollo del sistema neuronal. No obstante, diversos estudios realizados han encontrado una importante funcionalidad de estas moléculas en la organogénesis, vascularización/angiogénesis, oncogénesis y respuestas inmune. Las semaforinas tienen dos tipos de receptores principales: plexinas y neuropilinas, los cuales van a tener un papel en la señalización de las mismas. En este texto nos centraremos en la función de las semaforinas enfocada a la coordinación y regulación del sistema inmune.

Palabras Claves— Semaforinas, sistema inmune, células B, células T.



1. INTRODUCCIÓN

Las semaforinas se identificaron originalmente en el sistema nervioso, como factores de orientación de los axones involucrados en el desarrollo del sistema neuronal. Sin embargo, se ha demostrado que numerosas semaforinas denominadas “semaforinas inmunológicas” están involucradas en diversas fases de las respuestas inmunes fisiológicas y patológicas, algunas regulan la activación de células inmunes o la diferenciación de las mismas, otras regulan el tráfico de estas células... Los miembros de la familia de las plexinas son los receptores de semaforinas más representativos y los complejos semaforinas-plexinas han sido determinados recientemente mediante estudios de cristalización.

Se conocen más de 20 tipos de semaforinas cuya función varía en un rango de procesos fisiológicos, incluyendo cardiogénesis, angiogénesis, vasculogénesis, osteoclastogénesis y regulación inmunológica. Las semaforinas están implicadas también en patogénesis incluyendo la tumorigénesis o metástasis tumorales, enfermedades neurodegenerativas, muerte súbita y desórdenes inmunológicos.

Las semaforinas se dividen en 8 subclases. Las clases I, IV y VII de semaforinas están asociadas a la membrana mientras que las clases II, III y VIII son secretadas. Las plexinas y las neuropilinas (Nrps) son los receptores primarios de las semaforinas.

El tráfico coordinado de las células y la comunicación célula-célula son cruciales para inducir las respuestas del sistema inmunitario. Las semaforinas asociadas a la membrana juegan un papel en la regulación inmunológica de la homeostasis y están involucradas en la patogénesis de numerosas enfermedades estudiadas en modelos animales. [1].

2. LAS SEMAFORINAS Y SUS RECEPTORES.

Las semaforinas se caracterizan por un dominio amino terminal extracelular, el cual está muy conservado, denominado dominio “sema”. Basado en la similitud de la estructura de su extremo C terminal y la secuencia de aminoácidos, este grupo diverso de proteínas se divide en 8 subclases, mencionadas anteriormente. Las semaforinas de los invertebrados se incluyen en la clase I y II mientras que las clases IV-VIII pertenecen a los vertebrados. Las semaforinas codificadas por virus pertenecen a la clase VIII. Las clases I y IV-VII son semaforinas asociadas a membrana, mientras que las de clase II, III y VIII son secretadas. Hay dos grupos de proteínas que actúan como receptores principales de semaforinas: plexinas y neuropilinas. La mayoría de las semaforinas asociadas a membrana utilizan las plexinas como receptores mientras que las semaforinas solubles de clase III (excepto Sema3E que se une directamente a la plexina-D1) requieren neuropilinas como coreceptores obligados. Sin embargo, hay estudios que demuestran que las semaforinas también señalizan de forma independiente a las plexinas, a través de otros receptores. Por ejemplo, las semaforinas de clase VI, denominadas también Sema4A y Sema4D interactúan con inmunoglobulinas y dominios de la mucina que contienen la proteína 2 (TIM-2) y CD72 de las células T, respectivamente. Otro ejemplo es el de Sema7A emplea las integrinas para ejercer sus funciones fisiológicas tanto en el sistema inmune como en el sistema nervioso. En los últimos años se han estudiado los mecanismos mediante los cuales las semaforinas trasducen las señales a través de sus receptores. La plexina A1 presenta las funciones más importantes en la modulación de la organización del citoesqueleto, regulando la actividad GTP-asa, así como la actividad de los receptores citoplasmáticos tipo quinasa, en los cuales el dominio citoplasmático de las plexinas tiene actividad T-Ras GAP intrínseca y las moléculas efectoras asociadas a plexinas pueden modular las vías de

señalización: Rho, AKT y MAP. Además, la plexina B1 se asocia con el receptor tirosina quinasa Met y ErbB2 induciendo el crecimiento de células epiteliales. Estas observaciones muestran la complejidad de la señalización de las semaforinas y el amplio espectro de interacción molecular que presentan, permitiéndoles infinitas funciones. [2]

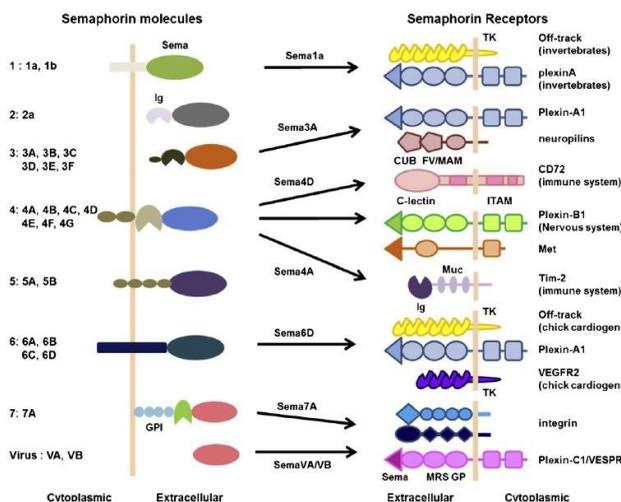


Figura 1. Representación de las semaforinas y sus receptores [2]

3. Las semaforinas y el Sistema Inmune

Las semaforinas fueron descubiertas originalmente en el sistema nervioso. En los últimos años se han relacionado las funciones de las semaforinas con la regulación del sistema inmune. Se han encontrado estas moléculas en el microambiente celular de las células en desarrollo del timo de monos, lo cual sugiere que están involucradas en el desarrollo de las células T precursoras en el timo mediante quimio-repulsión. También se ha determinado que las células B tienen una baja expresión basal de Sema4D y está regulado por diversos estímulos como el lipopolisacárido y antiCD40. Numerosos estudios in-vitro han mostrado que Sema4D (CD100) está involucrado en la activación y proliferación de las células B en el contexto de las interacciones entre células B: la lecitina CD72 tipo C sirve como receptor funcional de Sema4D en el sistema inmune y se expresa tanto en células T como en células B. Así, CD72 es un regulador negativo de las células B, y su función está mediada por la fosfatasa de tirosina SHP-1, la cual es reclutada a los ITIMs fosforilados (motivos inhibitorios de los inmunoreceptores) de CD72. La unión de Sema4D a CD72 mejora la disociación de CD72 del complejo BCR, permitiendo la desfosforilación del ITIM de CD72, reduciendo de esta forma, las señales inhibitorias. Este mecanismo es importante para controlar la fuerza de las señales determinadas por el receptor BCR, sin embargo, no se conoce si tiene lugar el mismo mecanismo en las regulaciones que dependen de Sema4D. Estas interacciones contribuyen a la expansión de la población de células B en los centros germinales y ayuda en la selección de las

células B de alta afinidad mejorando las señales de supervivencia procedentes de las células T helper. Sema4D también se expresa de modo constitutivo en las células T y actúa sobre DCs, asegurando su activación y maduración que, a su vez, promueve la activación de las células T. De esta forma, DCs y células B son reguladas mediante Sema4D y usando CD72 como receptor principal.

La semaforina A de clase IV (Sema4A) es otro miembro de la subfamilia de estas proteínas que se ha localizado en algunos modelos murinos. En este modelo animal la expresión de Sema4A está muy regulada en las células T. Tras una estimulación del TCR, las células T son reguladas por Sema4A en 24 horas, aumentándose la expresión de IL-2. Además, se ha demostrado que Sema4A es necesario en el proceso de diferenciación de las células T helper. Se ha descrito que las células T CD4⁺ deficientes en Sema4A no se diferencian en células productoras de IFN- γ (Células TH1), sin embargo, si son capaces de diferenciarse con normalidad en células productoras de IL-4 (células TH2).

En los últimos años también se ha determinado que Sema6D tiene funciones reguladoras sobre la función de DCs. Varias poblaciones de linfocitos, incluyendo las células B y T y las células NK presentan alta expresión de mRNA codificante para Sema6A. Igualmente, otros estudios indican que las DCs derivadas de la médula ósea, en respuesta a Sema6D producen IL-12, incrementando la expresión de moléculas de complejo de histocompatibilidad de Clase II.

Por otro lado, Sema7A se expresa en células T activadas y muestran una regulación positiva en la función del sistema inmune. Sema7A es reclutada en los "lipids rafts" en la sinápsis inmunológica producida entre las células T y los macrófagos, donde interactúan con la integrina $\alpha 1\beta 1$, que ha sido identificada como "ancla" que interactúa con la matriz extracelular para retener células efectoras como macrófagos, en los sitios de inflamación. Por lo que Sema7A parece estar implicada en los procesos de inflamación. [3]

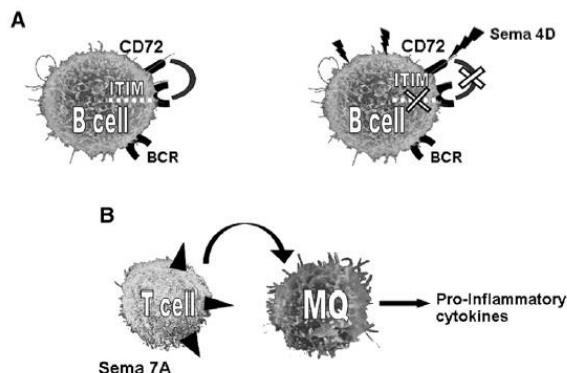


Figura 2. "a" Interacción inhibitoria entre BCR y CD72 vía ITIM (señalización inhibitoria). "b" Reclutamiento de Sema7A en los "lipids rafts" en la sinápsis inmunológica entre células T y macrófagos. Esta interacción es crucial para la activación de macrófagos y la producción de citoquinas proinflamatorias. [3]

4. Semaforinas y autoinmunidad

A pesar de la creciente cantidad de datos acerca de la participación de la familia de las semaforinas en el sistema inmune, no se tiene tanto conocimiento acerca de su acción en los procesos de autoinmunidad. Un estudio reciente en ratones propensos a padecer Lupus se ha demostrado que el alelo MRL de CD72 podría contribuir en el desarrollo de la vasculitis, sugiriendo una posible involucración de CD72 (receptor de la semaforina 4D) en esta enfermedad autoinmune.

De acuerdo con los descubrimientos en los modelos murinos, la expresión de CD72/CD100 (semaforina 4D) en los linfocitos de la sangre periférica de pacientes con Lupus-nefritis, se ha examinado y correlacionado con el estado clínico. La expresión de la molécula de CD72 y el mRNA en células B decrece en SLE con Lupus-nefritis, mientras que la expresión de CD100 de células T CD8⁺ y CD4⁺ es similar a las muestras control. El decrecimiento en la expresión de CD72 se encontró en pacientes con Lupus-nefritis asociado con la enfermedad SLE. También se encontró una disminución en la expresión de CD72 relacionada con el cambio de tipo de células B, lo que indica una alteración de la función en la regulación de CD72 en esta enfermedad.

Mediante métodos de proteómica se ha determinado la regulación de proteínas inflamatorias en la Artritis reumatoide sinovial. En estas proteínas, el aumento del precursor de la semaforina 7A en los fluidos sinoviales y en los sinoviocitos de pacientes con Artritis reumatoide se asocian específicamente con la actividad de la Artritis reumatoide. [3]

5. Conclusiones

Todos los estudios realizados indican que las semaforinas están involucradas en distintas fases de regulación del sistema inmune, desde la respuesta inicial hasta la respuesta inflamatoria producida. Son moléculas encargadas de mantener la homeostasis inmunológica, regulando y coordinando los diferentes sistemas de comunicación de células inmunitarias. Por estos motivos, son moléculas que se ven inmersas en patologías asociadas al sistema inmunológico. A pesar de lo conocido hoy en día, aún queda mucho trabajo por delante para determinar todos los procesos en los que las semaforinas están implicadas para contribuir en los procesos inflamatorios y las enfermedades autoinmunes. Esto abre un campo muy sugerente de posibles dianas terapéuticas con objetivo de tratar las patologías asociadas a la autoinmunidad. [3]

Referencias

- [1] H. Takamatsu and A. Kumanogoh, "Diverse roles for semaphorin/Splexin signaling in the immune system", *Trends in Immunology* March 2012, Vol. 33, No. 3.
- [2] S. Kanga and A. Kumanogoh, "Semaphorins in bone development, homeostasis, and disease", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2012 Elsevier.
- [3] Z. Vadasz, D. Attias, A. Kessel and E. Toubi, "Neuropilins and semaphorins – from angiogenesis to autoimmunity", *Autoimmunity Reviews* 9 (2010) 825–829.



Paula Callejo García
Biotecnología
5º Curso

La flora bacteriana y el sistema inmune

Gema Villa Fombuena

Resumen— En el tracto gastrointestinal, coexiste con nuestro organismo un amplio y heterogéneo grupo bacterias no patógenas que no sólo van a contribuir al procesamiento de los alimentos que ingerimos, sino que también tienen una importante relación con nuestro sistema inmune. Existen diversas hipótesis sobre cómo el sistema inmune es capaz de diferenciar entre las bacterias de la flora, beneficiosas, y las patógenas, que intentan infectar al individuo.

Palabras Claves— Bacterias, Intestino, Mucosas, Mutualismo, Sistema Inmune.

1. INTRODUCCIÓN

La flora bacteriana es el término que se utiliza habitualmente para referir el conjunto de bacterias no patógenas que habitan de forma estable en nuestro organismo. La actividad de estas bacterias suele asociarse

al proceso digestivo y a la absorción de nutrientes, pero también parecen tener un importante impacto en el desarrollo y funcionamiento del sistema inmune.

La florapresente en nuestro tracto gastrointestinal varía a lo largo del mismo: en la cavidad oral se pueden encontrar hasta 200 especies bacterianas diferentes, el

estómago es prácticamente estéril y la mayor concentración de bacterias se da en el intestino, con aproximadamente 10^8 bacterias por gramo de contenido del intestino delgado y 10^{12} por gramo de contenido del intestino grueso. Concretamente, en el intestino grueso coexisten hasta 500 especies diferentes. Los tipos de bacterias que constituyen la flora son anaerobias obligadas, aerobias y aerobias facultativas. En el colon, encontramos mayormente anaerobias obligadas, y las más abundantes pertenecen al género *Bacteroides*, principalmente *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* y *Clostridium* [1].

2. CONTRIBUCIÓN DE LA FLORA BACTERIANA

Todo el gran conjunto heterogéneo de bacterias que se encuentran en nuestro organismo mantiene con nosotros una relación de tipo mutualista. Por una parte, las bacterias se benefician de un entorno estable y rico en fuentes de energía, procedentes de los alimentos que ingerimos. Por otra, nosotros nos beneficiamos de las importantes contribuciones de la flora, como son:

- a. La degradación de ciertos componentes, presentes en los alimentos, para los cuales no poseemos de forma natural las enzimas necesarias, como ocurre con la celulosa y otros polisacáridos, que son fuentes importantes de energía en el intestino grueso y que, en ausencia de la flora, no nos serían de ninguna utilidad. Así mismo, algunos compuestos de origen bacteriano, resultantes de la actividad de la flora, son utilizados en rutas metabólicas del hospedador, como son los ácidos grasos de cadena corta y las poliquinonas. [2]
- b. La competencia por el espacio y las fuentes de energía con los microorganismos patógenos que acceden al organismo, dificultándoles a estos la colonización y, por tanto, impidiendo el éxito de la infección. [2]
- c. La colonización microbiana del tracto gastrointestinal afecta a la estructura de los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*). De hecho, la interacción entre la flora bacteriana y los GALTs en las primeras etapas de la vida es necesaria para el desarrollo completo del sistema inmune de las mucosas [1].

Esta última contribución de la flora destaca la importancia que tiene la presencia de estas bacterias no patógenas para la actividad del sistema inmune. Diversos estudios comparan el desarrollo de los tejidos linfoides en ratones criados en un ambiente libre de gérmenes, frente a otros criados en condiciones normales, en las que su tracto gastrointestinal va a ser colonizado por microorganismos [2]. En los ratones que no están expuestos a gérmenes, por lo que no presentan microbiota en su tracto digestivo, el bazo y los nódulos linfáticos no tienen una estructura completamente desarrollada, con las regiones correspondientes a células B y T escasamente formadas; además, presentan bajos niveles de inmunoglobulina G (IgG), debido a que la ausencia de flora altera los perfiles de expresión de las células plasmáticas secretoras de este anticuerpo en el intestino. Todos estos efectos pueden

revertirse tras varias semanas de colonización con bacterias no patógenas, lo que puede lograrse simplemente introduciendo un ratón crecido en ambiente normal en la jaula de los ratones libres de gérmenes. Aunque pueda parecer un medio artificial para conseguir este objetivo, este tipo de colonización es muy similar a la que experimenta cada recién nacido durante los primeros días tras su nacimiento. Esto es, la colonización del tracto gastrointestinal y la consecuente formación de la flora bacteriana son esenciales para el correcto desarrollo del sistema inmune y los órganos involucrados.

3. LA FLORA EN EL INTESTINO

El epitelio intestinal constituye una primera barrera física para impedir la entrada a los microorganismos, tanto residentes como patógenos, hacia tejidos más internos. Las células epiteliales intestinales se encuentran sobre un tejido conectivo denominado lámina propia, en el que se encuentran algunas células plasmáticas, dendríticas y macrófagos. Estas células epiteliales forman una monocapa que separa la lámina propia del lumen intestinal, donde se encuentra la flora bacteriana (figura 1). Esta barrera está reforzada en la superficie expuesta al lumen por la mucosa que recubre todo el intestino. La mucosa consiste principalmente en una red de polisacáridos relativamente espesa y viscosa, donde los gérmenes quedan atrapados, y son eliminados por el movimiento peristáltico del intestino, así como por el constante flujo procedente del tracto digestivo. Tanto en la mucosa como en el lumen, se encuentran también defensinas (moléculas antibacterianas), secretadas por las células epiteliales, e IgA, secretada por células plasmáticas desde la lámina propia. Además de las células epiteliales, existen células especializadas, como son las células M, que se encuentran sobre nódulos linfoides asociados al intestino, denominados placas de Peyer [3].

Aquellas bacterias que consiguen alcanzar y atravesar el epitelio son rápidamente destruidas por los macrófagos presentes en la lámina propia. Las bacterias también pueden intentar sobrepasar la barrera del epitelio introduciéndose en las placas de Peyer, atravesando para ello las células M, pero una vez dentro de la placa, son igualmente fagocitadas por macrófagos. No obstante, si son fagocitadas por células dendríticas, pueden sobrevivir en el interior de estas células durante varios días, de forma que dichas células dendríticas, cargadas con bacterias, interactuarán con linfocitos T o B (activándolos e induciendo la producción de IgA) en las placas de Peyer y podrán migrar también hacia los nodos linfáticos mesentéricos, que funcionan como una nueva barrera que impide a las bacterias (que han logrado avanzar "ocultas" en el interior de células dendríticas) continuar hacia tejidos linfáticos secundarios sistémicos [2], [4].

La principal diferencia entre las bacterias patógenas y las que constituyen la flora bacteriana es la capacidad de las primeras para invadir la mucosa y el epitelio intestinal, así como los fuertes factores de virulencia que poseen estas bacterias. Las bacterias patógenas disponen por tanto de estrategias mucho más violentas que las residentes

para atravesar la mucosa, introducirse o modificar las células epiteliales, e incluso sobrevivir durante más tiempo en el interior de las células dendríticas, pudiendo así estimular una respuesta más intensa en los nodos linfáticos mesentéricos y disparar una respuesta local o sistémica mucho mayor que la que pueden provocar las residentes cuando logran atravesar el epitelio intestinal [3].

4. RELACIÓN ENTRE LA FLORA Y EL SISTEMA INMUNE

Diversos mecanismos se han propuesto para explicar cómo el hospedador puede discriminar entre las bacterias residentes, en principio no dañinas, y aquellas patógenas que entran al sistema, incluso aunque a veces ambas compartan patrones moleculares idénticos. Entre los posibles mecanismos, encontramos: ignorancia, a nivel sistémico, de la existencia de estos microorganismos beneficiosos; expresión compartimentalizada de PRMs; y la atenuación bacteriana de la respuesta pro-inflamatoria.

Las células dendríticas que han fagocitado bacterias en

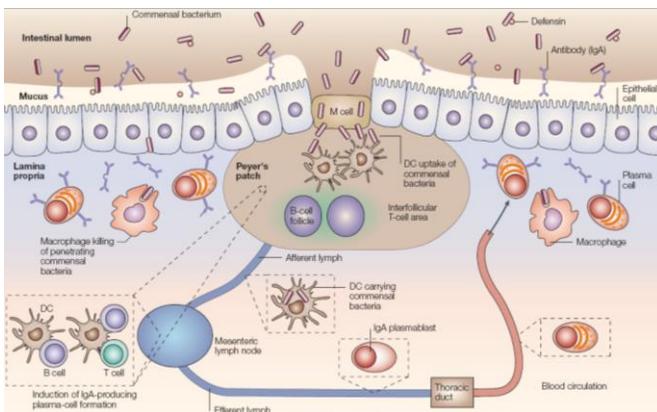


Figura 1. Mucosa, epitelio intestinal y lámina propia.

las placas de Peyer no suelen sobrepasar los nódulos linfáticos mesentéricos, por lo que estas células parecen estar confinadas al sistema inmune de las mucosas. Los linfocitos B y T que son activados en las placas de Peyer circulan por los vasos linfáticos intestinales, acaban entrando en la circulación sanguínea a nivel del conducto torácico y volverán de nuevo a la lámina propia, de forma que la inducción de las respuestas de linfocitos T y B queda limitada a la mucosa, donde es requerida. Así, hay una importante respuesta inmune local a nivel intestinal, pero, como las bacterias no patógenas no suelen sobrepasar los nódulos linfáticos mesentéricos, parece ser que el sistema inmune sistémico ignoraría en gran medida la existencia de estas bacterias residentes. Más aún, podría decirse que el reconocimiento, por parte del sistema inmune sistémico, de estas bacterias de la flora es relativamente innecesario, puesto que el sistema inmune innato es capaz de destruir todo aquel microorganismo, patógeno o no, que logre traspasar la barrera intestinal. Esta hipótesis considera que el organismo ignora a nivel sistémico la existencia de las bacterias de la flora, pero que son los elementos solubles bacterianos, que sí entrarían al torrente sanguíneo, los que propician el desarrollo completo de la estructura de los tejidos linfoides secundarios [2].

Otra hipótesis plantea que el organismo es capaz de di-

ferenciar directamente las bacterias residentes de las patógenas, gracias a los receptores PRM del hospedador (*pattern recognition molecules*), que reconocen de forma específica constituyentes moleculares invariantes característicos de las bacterias, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) [3]. En el intestino, existen dos tipos de PRMs que participan en el sistema inmune de las mucosas: los TLRs (*Toll-like receptors*) y los NLRs (*Nod-like receptors*). Los TLRs son receptores anclados a membrana que se expresan tanto en la superficie celular como asociados a orgánulos intracelulares; los NLRs se localizan en el citosol. Parece ser que la expresión compartimentalizada de algunos tipos de PRMs evita que estos sean activados por bacterias de la flora, y, por tanto, que dichas bacterias disparen una respuesta inmune. Por ejemplo, el receptor TLR5, capaz de reconocer flagelina, se expresa en la membrana basolateral de las células epiteliales, esto es, en la superficie celular expuesta hacia la lámina propia, por lo que se evita así la estimulación de estos receptores debida a la flagelina de las bacterias que se encuentren en la mucosa o en el lumen, que serán principalmente las que componen la flora bacteriana [2], [4].

Una tercera hipótesis establece que el equilibrio entre la flora bacteriana y el sistema inmune se mantiene gracias a un proceso denominado inflamación fisiológica o inflamación controlada. La flora intestinal no deja de constituir un conjunto de antígenos luminales que provoca la infiltración de numerosas células mononucleares en la lámina propia, lo que da lugar a su vez a fenómenos de inflamación. Las bacterias de la flora parecen poseer mecanismos inmunosupresores para contrarrestar esta inflamación, principalmente inhibiendo las señales proinflamatorias mediadas por NF- κ B, a través de la estabilización de su inhibidor central I κ B α (que actúa reteniendo dímeros inactivos de NF- κ B en el citosol). La incubación de células epiteliales junto con *Salmonella* no patógena induce la acumulación de I κ B α , mediada por la disminución de la ubiquitinización de esta proteína y, por tanto, de su degradación (necesaria para liberar y activar NF- κ B) [5], [3].

5. CONCLUSIONES

La flora bacteria intestinal realiza tres principales contribuciones al organismo del hospedador: procesamiento de compuestos que no son asimilables de forma natural por el individuo, competencia con microorganismos patógenos que acceden a las mucosas e interacción con el sistema inmune necesaria para el correcto desarrollo de órganos linfoides secundarios.

Los mecanismos por los cuales las bacterias que constituyen la flora intestinal no sólo no provocan una respuesta inmunológica sistémica (como ocurre con las bacterias consideradas patógenas), sino que, además, son necesarias para mantener un funcionamiento adecuado del mismo, aún no se conocen en profundidad. Se plantean algunas hipótesis que consideran que este delicado equilibrio es posible bien porque el sistema inmune ignora la existencia de estas bacterias de la flora, bien porque las

detecta y diferencia de las patógenas, o bien porque son las propias bacterias de la flora las que regulan la respuesta inmunológica para coexistir con el organismo. No sería descartable que este equilibrio, mantenido entre las bacterias de la flora (que no dejan de ser microorganismos extraños) y el sistema inmune del individuo que colonizan, sea una combinación compleja de varios de estos posibles eventos. Un mayor conocimiento de la relación entre la flora bacteriana y el sistema inmune puede además contribuir al desarrollo de tratamientos para enfermedades inflamatorias del intestino, como es la enfermedad de Crohn.

REFERENCIAS

- [1] G. O. Canny and Beth A. McCormick, "Bacteria in the Intestine, Helpful Residents or Enemies from Within?", *Infection and Immunity*, vol. 76, no. 8, pp. 3360-3373, May 2008, doi: 10.1128/IAI.00187-08.
- [2] A.J. Macpherson and N.L. Harris, "Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system", *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, pp. 478-485, Jun 2004, doi:10.1038/nri1373.
- [3] J.G. Magalhaes, I. Tattoli and S.E. Girardin, "The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens", *Seminars in Immunology*, vol. 19, no. 2, pp. 106-115, Apr 2007, doi: 10.1016/j.smim.2006.12.006.
- [4] M. Tsuji, K. Suzuki, K. Kinoshita, S. Fagarasan, "Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis", *Seminars in Immunology*, vol. 20, no. 1, pp.59-66, Feb 2008, doi: 10.1016/j.smim.2007.12.003.
- [5] L. Biancone, I. Monteleone, G. Del Vecchio Blanco, P. Vavassori and F. Pallone, "Resident bacterial flora and immune system", *Digestive and Liver Disease*, vol. 34, sup. 2, pp. S37-S43, Sep 2002, doi:10.1016/S1590-8658(02)80162-1.



Gema Villa Fombuena es alumna de 5º curso de licenciatura en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide.

Uso de anticuerpos monoclonales como tratamiento antibacteriano

Ana Isabel Casas Guijarro

Resumen— La utilización de anticuerpos monoclonales (mAbs) con fines antibacterianos data del siglo XIX. Sin embargo, tras un periodo de desuso de nuevo se está considerando la utilización de este tipo de tratamientos. Las dianas a las que se dirigen son variadas, según se traten de proteínas de membrana o libres en el medio. Ahora bien, en cualquier caso el empleo de mAbs está haciendo posible la eliminación de patógenos que los anticuerpos comunes no son capaces de erradicar, todo ello como consecuencia de la aparición de microorganismos resistentes a dichos fármacos.

Palabras Claves— Bacteria, Fármaco, mAbs, Resistencia, Toxina

1. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) están siendo utilizados recientemente para el tratamiento de diversos tipos de cáncer así como enfermedades antiinflamatorias. Ahora bien, antiguamente ya habían sido utilizados con un fin muy distinto ya que la diana involucrada no era otra que un microorganismo. Su alta especificidad permitió utilizarlo como diana para patógenos cosa que tiempo después se desechó pasando a ocupar un segundo plano. Sin embargo, dicho potencial ha sido redescubierto con el objetivo de erradicar infecciones provocadas por patógenos con características que impiden su eliminación mediante el uso de fármacos comunes [1].

2. TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS

2.1. Antecedentes

Durante las primeras décadas del siglo XIX, los anticuerpos comenzaron a utilizarse como tratamiento contra infecciones producidas por determinados patógenos bacterianos, como por ejemplo la difteria y el tétanos [1]. Para ello, se utilizó suero procedente de caballos o ratones inmunes a la patología con el que eran tratados los pacientes que sufrían la enfermedad a tratar. [1], [2]. A pesar de que en algunas ocasiones su administración provocaba reacciones alérgicas o determinados efectos adversos, la solución suministrada se convirtió en la forma más efectiva de prevenir o mejorar el curso de la enfermedad [2].

Años más tarde (1940s) fueron descubiertos y comercializados los primeros antibióticos efectivos de forma que la utilización de anticuerpos para tratar este tipo de infecciones dejó de utilizarse dada la efectividad y alta producción de estos fármacos [2].

2.2. Usos actuales

Recientemente podemos ver como el uso de antibióticos no permite la eliminación de determinadas infecciones bacterianas dada la resistencia que ejercen dichos microorganismos a los fármacos suministrados, dando lugar a la aparición de las denominadas: bacterias resistentes, resultando ser las más problemáticas *Staphylococcus aureus* así como el género *Clostridium* [1]. De hecho, uno de los nichos más afectados es aquel que engloba a los antibióticos betalactámicos (derivados de la penicilina y cefalosporina) utilizados para tratar infecciones de origen diverso [3].

Consecuencia de ello, se ha considerado la utilización de anticuerpos monoclonales (mAbs) para luchar contra infecciones bacterianas producidas por estos patógenos. Todo ello mediado por tecnología biotecnológica novedosa que ya ha permitido utilizar estas proteínas con fines

anticancerígenos y antiinflamatorios [1].

3. PRINCIPALES DIANAS

A la hora del diseño de los mAbs a utilizar es necesario conocer a la perfección las dianas a las que van dirigidas [1].

3.1. Enterotoxinas

Existen multitud de bacterias que presentan en su superficie compuestos tales como ácido lipoteicoico, peptidoglicanos o diversos polisacáridos que son reconocidos por receptores pertenecientes a la familia *Toll-like receptors* (TLR) provocando con ello una respuesta inmune innata asociado a un cuadro inflamatorio y posterior inicio de la infección [4].

En base a esto, se están desarrollando anticuerpos capaces de unirse a estos componentes celulares y mediante un mecanismo de opsonización, modulación de anticuerpos o muerte directa ser capaz de eliminar el patógeno del organismo reduciendo con ello tanto la infección, como la inflamación producida [1]. De hecho, existen multitud de mAbs diseñados que a día de hoy están siendo testados en las diferentes fases clínicas requeridas (Tabla 1).

TABLA 1
ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS A
ENTEROTOXINAS

Patógeno	Endotoxina	Patología asociada	Tratamiento con mAbs	Naturaleza del mAb	Fase de desarrollo
E. coli	Lípido A (LPS)	Sepsis mediada por Gram-negativas	Nebacumab, Edabacomab, y T88	IgM	Desaprobado. Falta de eficacia y seguridad
	Ácido lipoteicoico	Sepsis mediada por <i>Staphylococcus</i>	Pagibaximab	Quimérico Humano/Ratón (IgG1)	Fase clínica III
S. aureus	Clf A	Bacteriemia (Bacterias en sangre)	Tefibazumab	Humano (IgG1)	Desaprobado. Fase II
	GrfA (Familia transportadores ABC)	Sepsis mediada por <i>Staphylococcus</i>	Aurograb	-	Desaprobado. Fase III
	PcrV (Sistema de secreción T3SS)	Infecciones pacientes fibrosis quística	KB-100 (PEGylated Fab)	Humano	Fase II
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	O-antígeno carbohidrato (Serotipo O11)	Neumonía	Panobacumab	Humano	Fase II
	Alginato	Infecciones pacientes fibrosis quística	Aerucin	Humano (IgG1)	-

Tabla 1. Se indican los diferentes mAbs diseñados para cada una de las patologías y los microorganismos que las producen. Asimismo, se muestran las dianas a las que se dirigen dichos anticuerpos además de su origen y la fase de desarrollo clínico en la que se encuentra el fármaco actualmente.

3.2. Toxinas solubles

En muchos casos la infección no está provocada por el reconocimiento de compuestos presentes en la superficie del patógeno sino que el microorganismo libera al exterior toxinas que promueven dicha respuesta [1]. Estas proteínas son también denominadas superantígenos dada su capacidad de activar células T de forma masiva mediante la unión a MHC tipo II o directamente a sus receptores. Por tanto, la presencia de concentraciones picomolares de la toxina desencadena la secreción masiva de citoquinas proinflamatorias al exterior y con ello el inicio de la infección [4].

Ahora bien, en el caso de las toxinas solubles, cabe destacar su contribución a la infección más allá de su liberación al medio, ya que a pesar de la eliminación del patógeno la presencia de la toxina se mantendrá en los tejidos, de ahí la necesidad de eliminarla de forma específica. Asimismo,

la acción de antibióticos sobre los patógenos provoca su lisis causando con ello un aumento de toxina liberada al medio asociado a la consiguiente respuesta de estrés por parte del tejido afectado [1].

3.2.1. Toxina: Shiga

La liberación de la toxina Shiga (Stx1 y Stx2) por parte de determinadas cepas de *Escherichia coli* provoca una de las infecciones alimentarias con más incidencia de los últimos tiempos, especialmente en países industrializados (Síndrome Urémico Hemolítico) [5], [1]. Dicha toxina se une a un receptor presente en la membrana de las células epiteliales (globotriaosilceramida) de pequeños vasos del riñón y colon provocando la inhibición de la síntesis de proteí-

nas y con ello la muerte celular [5].

En base a esto se está trabajando en el desarrollo clínico de mAbs que actúen neutralizando la toxina [1]. De hecho, en 2005 se logró diseñar un mAb (IgA) contra Stx 1B a partir de tejido linfático (nasal) de ratón que tenía la capacidad de inhibir la unión de la toxina con su ligando natural en la célula diana [6]. Asimismo, se ha desarrollado un fármaco denominado Shigamabs que se encuentra actualmente en fase clínica II. Está constituido por la combinación de dos mAbs (IgG1) cuya diana específica es Stx1 y Stx2 (Figura 1), por lo que serán capaces de unirse a ellas y eliminarlas de la circulación sanguínea, erradicando con ello la infección provocada [1].

Este ejemplo constituye uno de los más significativos en cuanto a eliminación de toxinas solubles se refiere. Ahora bien, existen otros fármacos en desarrollo basados en la utilización de mAbs capaces de tratar diversas patologías (Tabla 2) [1].



Figura 1. Estructura cristalizada de la holotoxina producida por *Shigella dysenteriae* a una resolución de 2.5 Å

4. CÓCTEL DE MABS

En muchas de las infecciones tratadas se están empleando sueros ricos en más de un anticuerpo monoclonal. El uso de estas combinaciones de mAbs (dobles o triples) permite cubrir un amplio rango de acción así como aumentar la potencia de neutralización del fármaco [1], [7]. Por tanto, esta nueva plataforma terapéutica se cree capaz de superar las carencias funcionales que supone el uso de un único anticuerpo ya que será posible atacar al microorganismo a través de diferentes vías, cada una de ellas mediada por la interacción específica anticuerpo-ligando [1], [7].

5. EFICACIA VS FALLOS

El uso de estas proteínas como tratamiento antibacteriano garantiza una baja toxicidad del fármaco, así como alta especificidad. Además, su administración en muchos casos se lleva a cabo de forma combinada junto a antibióticos produciéndose con ello un efecto sinérgico entre ambos compuestos [1].

En contraposición, se ha comprobado que el uso de mAbs está asociado en muchos casos con fallos farmacodinámicos y farmacocinéticos debido al escaso conocimiento que aun se tiene de su mecanismo de acción. Al mismo tiempo, la excesiva especificidad que poseen puede implicar dificultades a la hora de su administración a animales de laboratorio ya que en muchos casos no son afectados por las mismas cepas bacterianas que atacan a humanos [1].

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

El uso de anticuerpos de forma combinada con los avances tecnológicos actuales, que permiten su modificación mediante ingeniería genética, convierte a este novedoso tratamiento en uno de los avances más acusados de su generación [7]. Asimismo, hace posible combatir una de las problemáticas clínicas con más incidencia actualmente, la aparición de bacterias resistentes. De forma que sería posible tratar este tipo de patógenos mediante tratamientos poco invasivos y de alta especificidad sirviendo como alternativa a los métodos insuficientes con los que contamos actualmente [1].

TABLA 2
ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS A
TOXINAS SOLUBLES

Patógeno	Patología asociada	Tratamiento con mAbs	Naturaleza del mAb	Fase de desarrollo	Mecanismo de acción
<i>Bacillus anthracis</i>	Ántrax	Raxicumab, AVP-21D9, Valortin, IQNPA y W1	Humano	-	Impide unión toxina-receptor
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo	Xoma 3AB	Coctel: NX01, NX02, NX11 (IgG1)	Fase I	Unión a los serotipos A1, A2, A3 y A4 (toxina)
<i>Clostridium difficile</i>	Colitis y diarrea	GS-CDA	Humano	Fase II	Unión a la toxina A
		MDX-1388	Humano	Fase III	Unión a la toxina B

Tabla 2. Se muestra tanto la patología como el patógeno causante de la infección que es tratada con anticuerpos monoclonales cuyo nombre comercial queda (Tratamiento con mAbs). Asimismo, se presenta el origen del anticuerpo, su mecanismo de acción al unirse a su diana y la fase de desarrollo clínico en la que se encuentra actualmente

AGRADECIMIENTOS

Como autora de este artículo agradezco encarecidamente a todos aquellos investigadores cuyos estudios han permitido la realización de éste; no solo por el valor de los experimentos llevados a cabo sino también por la importante tarea de recopilación de información realizada por ellos.

REFERENCIAS

- [1] Martin B. Oleksiewicz, Gábor Nagy, Eszter Nagy, "Antibacterial monoclonal antibodies: Back to the future?", *Archives of Biochemistry and Biophysics* 526 (2012) 124–131, 13 June 2012.
- [2] A. Casadevall, D.L. Goldman and M. Feldmesser, "Antibody-based therapies for infectious diseases: renaissance for an abandoned arsenal?", *Bull. Inst. Pasteur*, 1997.
- [3] Maja Babic, Andrea M. Hujer, Robert A. Bonomo, "What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases", *Drug Resistance Updates* Volume 9, Issue 3, June 2006, Pages 142–156.
- [4] Roland Nau, Helmut Eiffert, "Minimizing the release of proinflammatory and toxic bacterial products within the host: A promising approach to improve outcome in life-threatening infections", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 44 (2005) 1–16, 28 January 2005.
- [5] Virginia Pistone Creydt, Pablo Nuñez, Javier Boccoli, Claudia Silberstein, Elsa Zotta, Jorge Goldstein, Cristina Ibarra, "Papel de la toxina shiga en el Síndrome Uremico Hemolítico", *MEDI-*

CINA (Buenos Aires) 2006; 66 (Supl. III): 11-15

- [6] Y. Imai, T. Ishikawa, T. Tanikawa, H. Nakagami, T. Maekawa, K. Kurohane, "Production of IgA monoclonal antibody against Shiga toxin binding subunits employing nasal-associated lymphoid tissue", *Journal of Immunological Methods* 302 (2005) 125–135, 13 June 2005.
- [7] Ton Logtenberg, "Antibody cocktails: next-generation biopharmaceuticals with improved potency", *TRENDS in Biotechnology* Vol.25 No.9.

[Figure 1] Fraser, M.E., Cherniaia, M.M., Kozlov, Y.V., James, M.N., "Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution", *Nat. Struct. Biol.* 1: 59–64, 1994, PDB.

BIOGRAFÍA



Ana Isabel Casas Guijarro cursa actualmente cuarto del Grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide. Se traslada a Sevilla desde Algeciras, su ciudad natal, para iniciar sus estudios superiores. En estos momentos prepara su Proyecto Fin de Grado en el Área de Genética de la Facultad de Ciencias Experimentales (UPO) al mismo tiempo que cursa las últimas asignaturas de su grado y realiza sus prácticas en una empresa biotecnológica de la provincia.

Deficiencia Selectiva de IgA

Sofía Doello Román

Resumen— La inmunoglobulina A (IgA) es el tipo de anticuerpo que se produce más abundantemente en el organismo humano y cuenta con un importante papel protector. La deficiencia selectiva de IgA es la inmunodeficiencia primaria más común y normalmente se debe a un defecto de maduración en los linfocitos B. A pesar de la importante función de esta molécula en el sistema inmunitario, la mayoría de personas que la padecen son asintomáticas. No obstante, en algunos casos produce una predisposición a padecer infecciones pulmonares y gastrointestinales, enfermedades autoinmunes y trastornos alérgicos. En el caso de las enfermedades autoinmunes, se piensa que el hecho de que exista una correlación con la deficiencia selectiva de IgA se debe a que tienen una causa genética común, relacionada con ciertos haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad.

Palabras Claves— Inmunodeficiencia, IgA, Función, Patogénesis, Autoinmunidad.

1. INTRODUCCIÓN

La inmunoglobulina A (IgA) es el tipo de anticuerpo que se produce de forma más abundante en el organismo humano, es el tipo más abundante en las secreciones y el segundo más abundante en la sangre, después de la IgG. En humanos existen dos subtipos: IgA1 e IgA2. La segunda, que es más resistente al ataque proteolítico

de las bacterias por contar en su estructura con una región bisagra más corta, es la más abundante en las secreciones mucosas.^[1]

La función de esta molécula en la respuesta inmunológica no se conoce completamente aún. Se cree que tiene un papel en la activación del sistema fagocítico, haciendo que los antígenos externos que reconoce sean eliminados de la circulación sin activar el sistema del complemento y sin causar inflamación. También se piensa que participa

en el control del sistema inmunológico a través de la inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos. [1,2]

La IgA se encuentra cubriendo las bacterias endógenas del tracto intestinal, la cavidad bucal y los tractos respiratorios y genitales. Esto hace que la adherencia y la capacidad de penetración de las bacterias sean limitadas y que se encuentren confinadas en la superficie de las mucosas. Su función protectora es muy importante. [1]

La deficiencia selectiva de inmunoglobulina A se define como la presencia de niveles bajos o la ausencia de IgA cuando los niveles de IgG e IgM son normales en un paciente de más de 4 años de edad en los que otras causas de agammaglobulinemia hayan sido excluidas. Se considera que hay deficiencia de IgA cuando los niveles son inferiores a 0,07 g/L, mientras que si son superiores a esta cantidad pero dos desviaciones típicas alejadas de la media se considera que hay deficiencia de IgA parcial. [1]

Se trata de la inmunodeficiencia primaria más común, con una frecuencia de 1 por cada 600 personas caucásicas. La mayoría de personas con deficiencia selectiva de IgA son clínicamente asintomáticas, aunque puede estar asociada a infecciones gastrointestinales y respiratorias, enfermedades autoinmunes y alergias. [3]

2. PATOGÉNESIS

Normalmente, los pacientes con deficiencia selectiva de IgA tienen un defecto de maduración en los linfocitos B que los hace no poder producir IgA. Ese defecto parece involucrar a las células madre, ya que la deficiencia de IgA se puede transferir por trasplante de médula ósea. Los genes que codifican para la IgA, $\alpha 1$ y $\alpha 2$, suelen ser normales, aunque en algunos casos hay deleciones. Al analizar por RT-PCR la expresión de estos genes en tres pacientes con deficiencia selectiva de IgA se encontró que los niveles ARNm eran demasiado bajos para ser detectados en ambos casos, mientras que en los cinco pacientes con deficiencia parcial de IgA mostraron bien niveles de bajos ARNm para ambos genes o bien ausencia de ARNm para uno de ellos y niveles normales para el otro. [1,4]

Además, la disfunción de linfocitos Th y la falta de ciertas citoquinas también se han asociado con la deficiencia selectiva de IgA. [1]

La susceptibilidad genética a padecer esta enfermedad no está bien definida. Parece no haber un patrón de herencia mendeliana definido (se han detectado casos de herencia autosómica recesiva, autosómica dominante y transmisión esporádica). Estos factores, junto con la falta de un defecto genético concreto, llevan a pensar que la deficiencia selectiva de IgA representa a grupo heterogéneo de anomalías genéticas. [1]

También se sabe que existe una relación entre la deficiencia selectiva de IgA y ciertos haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad, en particular con el haplotipo HLA-B8, DR3, DQ2 (8.1). La homocigosis para el haplotipo ancestral 8.1 incrementa el riesgo de desarrollar esta enfermedad. Otros haplotipos como HLA-DR7, DQ2 and DR1, DQ5 también están asociados con ella, mientras que DR15, DQ6 ofrece protección contra ella. [3]

3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

A pesar de que la IgA es un componente de suma importancia en el sistema inmunitario, el 80-95% de las personas que padecen deficiencia selectiva de IgA son asintomáticas. Sin embargo, algunos pacientes que padecen esta enfermedad tienen tendencia a desarrollar ciertos tipos de enfermedades o infecciones. [1]

Lo más común es que se den infecciones sinopulmonares recurrentes, principalmente debidas a bacterias como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, que pueden llegar a causar daños terminales. [1]

Dado que en la deficiencia selectiva de IgA la barrera-protectora del sistema gastrointestinal está dañada, también son comunes los casos de infecciones gastrointestinales, pues los patógenos pueden adherirse con más facilidad al epitelio y eso les permite proliferar y causar la infección. [1]

Los trastornos alérgicos y las enfermedades autoinmunes también son comunes en los pacientes con deficiencia selectiva de IgA. [1]

3. DEFICIENCIA SELECTIVA DE IGA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Se ha encontrado cierta relación entre la deficiencia selectiva de IgA y una serie de enfermedades autoinmunes: normalmente se encuentra sobrerrepresentada en poblaciones que padecen estas enfermedades, lo cual indica que es posible que exista un componente genético común. A continuación se exponen algunos ejemplos de las enfermedades mencionadas. [3]

3.1. Enfermedad de Graves

Se trata de un trastorno autoinmune que afecta al tiroides y se caracteriza por la infiltración linfocítica de esta glándula y la producción de autoanticuerpos contra los receptores de tirotrópina (TRAbs, de sus siglas en inglés). Se sabe que está asociada con el alelo HLA-B8 y con el DR3. Esto, sumado al hecho de que una gran proporción de las personas que padece enfermedad de Graves padecen también deficiencia selectiva de IgA, lleva a pensar que existe una asociación entre ambas enfermedades. [3]

3.2. Lupus Eritematoso Sistémico

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por el daño a los tejidos del propio organismo mediado por el sistema inmunitario. Se ha demostrado que está asociado a la región HLA-DR, en particular a los alelos HLA-DRB1*0301 y HLA-DRB1*1501 (en poblaciones europeas). Al analizar los loci HLA-B, -DR y -DQ por PCR específica de secuencia en pacientes con deficiencia selectiva de IgA y de lupus eritematoso se encontró que todos los pacientes con la primera presentaban el haplotipo HLA-B8, DR3, DQ2, mientras que de los pacientes con la segunda sólo un 20% lo presentaban en homocigosis. [3]

3.3. Diabetes

Es un trastorno autoinmune crónico caracterizado por la destrucción de las células β productoras de insulina en el páncreas. El locus más importante en esta enfermedad es el del MHC de clase II, siendo principalmente dos haplotipos los que dan predisposición a padecerla: DRB1*0301-DQB1*0201 (DR3, DQ2) y DRB1*0401-DQB1*0302 (DR4, DQ8). El análisis de 11 pacientes con diabetes tipo 1 reveló que aproximadamente el 27% presentaban el haplotipo HLA-B8, DR3, DQ2 en homocigosis y el 63% tenía una sola copia. [3]

3.4. Enfermedad Celíaca

Se trata de un trastorno crónico inflamatorio del tracto intestinal que se debe a una reacción inmune frente al gluten y otras proteínas relacionadas presentes en el trigo, el centeno y la cebada. Se encuentra fuertemente asociado con genes de la región del MHC de clase II; la mayoría de los pacientes portan el alelo HLA-DQ2 y/o -DQ8. [3]

El alelo HLA-DQ2, que es el que presenta una asociación más fuerte con la enfermedad celíaca, se encuentra a menudo codificado junto con HLA-B8 y HLA-DR3 en el haplotipo 8.1. [3]

5. CONCLUSIONES

La deficiencia selectiva de IgA es la inmunodeficiencia primaria más común. Resulta llamativo que, a pesar de la

gran importancia de este componente del sistema inmunitario en la defensa del organismo, la mayoría de las personas que padecen esta enfermedad son asintomáticas. Si bien es cierto que existe un porcentaje que tiene predisposición a padecer infecciones y enfermedades autoinmunes. En el caso de estas últimas se piensa que existe un componente genético común, relacionado con ciertos haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad. Un estudio más profundo de la base molecular de la deficiencia selectiva de IgA sería de gran utilidad para conocer mejor el papel de esta molécula en la defensa del organismo y su relación con otras enfermedades.

REFERENCIAS

- [1] L. Yel, "Selective IgA Deficiency," *J Clin Immunol* vol.30, pp. 10-16, 2010, doi: 10.1007/s10875-009-9357-x.
- [2] M A Kerr, "Function of immunoglobulin A in immunity," *Gut* vol. 47, vol.6, pp. 751-752, 2000, doi:10.1136/gut.47.6.751.
- [3] Wang et al., "Selective IgA Deficiency in Autoimmune Diseases," *Mol Med* vol. 17, pp. 1383-1396, Nov/Dec 2011, doi: 10.2119/molmed.2011.00195
- [4] H. Suzuki et al., "Various Expression Patterns of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ Genes in IgA Deficiency," *Allergology International* vol. 58, no.1, pp. 111-117, 2009, doi: 10.2332_allergolint.O-08-549



Sofía Doello Román

El Virus de la hepatitis C contra la célula. El papel del interferón en la defensa celular

Félix Reyes Martín

Resumen— El virus de la Hepatitis C o HCV es el culpable de que diariamente se detecten miles de casos diarios de nuevos infectados. Este virus cuando está en contacto con el organismo intentará colonizar las células hepáticas, apoderándose de su maquinaria celular y aprovechando los recursos de la célula para multiplicarse y reproducirse. Sin embargo, el sistema inmunitario posee un medio innato para la lucha contra este tipo de patógenos: el interferón. El sistema del interferón urdirá un entramado plan que organizará la respuesta del sistema inmune, luchando tanto desde el exterior celular (respuesta leucocitaria) como también desde el interior celular. Actualmente, los enfermos crónicos de hepatitis C luchan contra el virus administrándose, además de otros antiviricos, interferón exógeno que pondrá al organismo en guardia activando sus defensas.

Palabras Claves— Interferón, HCV, Hepatitis C, Sistema inmune, virus.

1. INTRODUCCIÓN

El HCV es un virus con envuelta compuesto por una cadena de ARN positiva (es decir, la cadena codificante) perteneciente a la familia Flaviviridae. El HCV infecta a humanos y a chimpancés y los hepatocitos son sus principales dianas. El ARN del virus es traducido por los ribosomas celulares formándose así una larga poliproteína que es escindida en proteínas virales maduras por proteasas celulares. La replicación del virus ocurre en el citoplasma, cerca de la membrana plasmática donde se forman complejos especializados para este trabajo. La replicación es muy dinámica, se estima que alrededor de 10 billones de viriones son producidos al día por un indi-

viduo.

viduo infectado. [4]

La respuesta innata es la primera barrera que pone el organismo ante una primera exposición al virus de la hepatitis C. La primera línea de defensa es constituida por el sistema del interferón. Diferentes tipos de moléculas se verán involucradas en este proceso que comenzará con el reconocimiento por parte de una célula ya infectada la presencia de un virus en su interior. Con la liberación del interferón se pondrá en alerta al organismo que urdirá un complejo plan para acabar con este invasor. [4]

2. EL INTERFERÓN

El interferón fue descubierto de forma paralela en dos laboratorios en la década de los cincuenta. Por una lado, dos virólogos japoneses, Yasu-ichi Nagano y Yasuhiko Kojima, hallaron que el crecimiento viral podía verse inhibido en ciertos tejidos de conejo donde previamente se habían inoculado virus inactivados por radiación UV, por lo que supusieron que debía existir un "inhibidor viral" en dichos tejidos, que cuatro años más tarde fue aislado por ellos mismos. Al mismo tiempo, Alick Isaacs y Jean Lindenmann descubrieron que ciertas células de pollo en contacto con virus inactivados producían una sustancia que interfería en la replicación viral de células vecinas, y la denominaron interferón.

A pesar de las dificultades iniciales para caracterizar esta molécula, el interés hacia ella fue en aumento a lo largo del siglo XX por varios motivos: tenía una alta actividad biológica, presentaba un efecto viral de amplio espectro, mostraba capacidad antiproliferativa, estaba presente en todas las especies de vertebrados analizados (aunque fuera específica de especie). Sin embargo, hubo que esperar a finales de los setenta para que los estudios con el interferón alcanzaran su punto álgido: la aparición de la ingeniería genética y la tecnología del ADN recombinante permitieron la síntesis del interferón en bacterias y, por tanto, la disponibilidad ilimitada de esta molécula para su estudio y posterior empleo. [1]

El interferón no es una sustancia antiviral por sí misma, sino que ejerce esta actividad induciendo la síntesis de otras proteínas con actividad antiviral intrínseca. Y, por otro lado, el interferón no se expresa de forma constitutiva, sino que su expresión se activa como respuesta a la entrada y detección de virus por las células del organismo. [1]

En términos generales, el sistema del interferón empieza cuando una serie de células que comienzan a sintetizar y secretar IFN al medio extracelular, en respuesta un agente inductor (la presencia de virus). Una vez el interferón es liberado al medio, éste se une a unos receptores de superficie de determinadas células y activa una cascada de transducción que llega hasta el núcleo, desencadenando la expresión de proteínas con actividad antiviral, que ejercen diferentes efectos, con lo que las células alcanzan el denominado "estado antiviral". Es decir, el sistema del interferón engloba tres pasos clave: inducción de los genes del interferón, transducción de la señal en respuesta a

IFN y establecimiento del estado antiviral. [3] [1]

2.1. Expresión de los genes IFN

Para la activación del sistema del interferón debe, en primer lugar, detectarse la presencia de virus en el organismo. La detección se inicia con la activa la ruta de señalización está compuesta por un receptor que detecta ARN de doble cadena en el interior celular (ARN vírico). Una proteína mitocondrial (MAVS) actúa downstream en esta ruta mediante la activación indirecta de una serie de reguladores de la expresión (IRF3 y NF-kb) que, en último término, conduce a la producción de IFN- β ([2]). De forma similar, en las células se expresa de forma constitutiva un factor de transcripción, llamado IRF-3, componente de un complejo multiproteico denominado DRAF. La activación de IRF-3 por fosforilación al detectar ARN de doble cadena conduce a su dimerización y translocación al núcleo, resultando en el inicio de la transcripción de IFN. [2][1]

2.2. Transducción de la señal y respuesta celular

La transducción de la señal se realiza a través de la ruta JAK-STAT. Esta ruta recibe el nombre los dos complejos proteicos que constituyen principalmente la cascada de señalización. Las familias JAK (Janus kinase) y STAT (Signal Transduction and Activator of Transcription) son responsables de diferentes funciones en la ruta de señalización de citoquinas. JAK quinasa recibe este nombre por el dios Jano, que tenía dos caras, una que miraba al exterior y otra al interior y que los romanos situaban en sus casas.

Con la activación de la ruta JAK-STAT se producirá la expresión génica de un conjunto de genes que tendrán carácter antiviral. Las proteínas que se generen lucharán desde el interior celular contra la actividad vírica del HCV e intentarán evitar que éste se reproduzca y se disperse. De entre este conjunto de genes cabe destacar a dos principales: el gen de la OAS y de la PKR. [4]

La OAS es una polimerasa que creará un tipo de oligonucleótido muy característico: un poliA con enlaces 2'-5'. Este característico oligonucleótido activará a una ARNasa (ARNsa L) cuya función será la de hidrolizar los ARN presentes en el citoplasma. Esta ARNasa no es capaz de distinguir entre transcritos virales o celulares con lo que provocará una parálisis de la traducción celular y finalmente en la apoptosis celular.

La PKR es una quinasa cuyos sustratos serán factores que intervienen en la traducción. Concretamente, el mejor estudiado es el factor eIF2a, cuya fosforilación provocará la inhibición de la traducción y, como en el caso de la OAS, la eliminación del virus por apoptosis celular.

Asimismo, se activarán genes que induzcan la presentación de antígenos víricos a los linfocitos T que serán capaz de reconocerlos e inducir apoptosis. También se activará la producción de diferentes interferones que coordinarán la respuesta inmune frente al ataque de este patógeno. [4][3] [1]

Desafortunadamente el virus de la hepatitis C ha sido capaz de desarrollar un conjunto de herramientas que le permiten escapar a este mecanismo de protección celular inducido por el interferón.

Por un lado, la proteína viral NS5A es capaz de inhibir la ruta JACK-STAT impidiendo la síntesis de interferón y por lo tanto el inicio de todo el entramado de regulaciones que acaban finalmente con la organización de una respuesta inmune robusta y con la activación de defensas intracelulares.

Por otro lado, el HCV es capaz también de inhibir a la proteína antiviral PKR. Ésta puede ser afectada de nuevo por NS5A, pero también puede inhibida por E2, otra proteína viral.

3. CONCLUSIÓN

De las personas que resultan infectadas con hepatitis C, la mayoría presenta infección crónica por este virus y por lo general no hay ningún síntoma. Si la infección ha estado presente durante muchos años, el hígado puede tener cicatrización permanente (cirrosis). En muchos casos, es posible que no haya síntomas de la enfermedad hasta que

se presente la cirrosis. [4]

El tratamiento farmacológico más eficaz se basa en la asociación de interferón administrado por vía subcutánea. De esta forma se produce una inducción constante de la expresión de genes antivíricos así como la estimulación del sistema inmune. Los efectos secundarios del interferón son numerosos, la mayoría incluidos en lo que se llama síndrome gripal. Al cabo de los meses provoca pérdida de masa muscular. Se suelen dar en combinación con fármacos que inhiban la actividad viral, como inhibidores de la polimerasa (la famosa NS5A). [4]

REFERENCIAS

- [1] Carrasco L, Almendral JM^º. (2006) Virus patógenos. Ed. Hélice 84-934106-0-8
- [2] Seth, R. B., Sun L. & Chen Z. J (2006) Antiviral innate immunity pathways. *Cell Research* 16: 141-147
- [3] Grandvaux N, Oever B R, Servant MJ and Hiscott J. (2002) The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion *Current Opinion in Infectious Diseases* 2002, 15:259±267
- [4] Heim M. H. (2012) Innate immunity and HCV *J Hepatol*. pii: S0168-8278(12)00772-6. doi: 10.1016/j.jhep.2012.10.005.

Vacunas de ADN

Cristina Mesa Núñez

Resumen—Las vacunas de Tercera Generación o vacunas de ADN constituyen una nueva vía de investigación para el desarrollo de vacunas más seguras con respecto al uso de patógenos desactivados, que podrían revertir su estado y dar lugar a una infección. No obstante, su aplicación no está exenta de problemas, entre los que cabe destacar su posible integración en el genoma humano o la baja inmunogenicidad inducida, así como el hecho de que aún no se ha conseguido implementar un método efectivo para su transfección a las células del organismo vacunado. Las nuevas alternativas y tecnologías desarrolladas para mejorar el uso de este tipo de vacunas constituyen el objetivo de este trabajo.

Palabras Claves—Antígenos asociados a tumores (TAA), ARN de interferencia (ARNi), Epigenética, Respuesta Inmune, Vacunas de ADN.

1. INTRODUCCIÓN

Las vacunas de ADN consisten en plásmidos portadores del gen que codifica al antígeno para el cuál se desea inducir la respuesta inmune. Este gen está precedido de un promotor fuerte eucariota que permite la expresión de la proteína *in vivo* en el organismo vacunado [1]. Gracias a los proyectos de secuenciación masiva se ha llegado a conocer el genoma de multitud de microorganismos, incluyendo numerosos patógenos, lo que ha facilitado la identificación de antígenos que puedan ser útiles

para inducir protección frente a una infección. Además, el desarrollo de éstas vacunas no sólo está destinado a la prevención de enfermedades, sino también a la creación de vacunas terapéuticas [2]. Así, se han aplicado con éxito en modelos animales para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas, autoinmunes, alergias y cáncer [1].

Las vacunas de ácido nucleico presentan una serie de características a favor de su aplicación. Entre ellas se encuentra la seguridad que proporcionan frente al uso de patógenos inactivos, por el hecho de clonar sólo el gen que codifica al antígeno deseado, careciendo de capaci-

dad infectiva; o de la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Esta característica hace posible extender su aplicación a personas inmunodeprimidas. Por otro lado, la síntesis *in vivo* del antígeno permite que se lleven a cabo todas las modificaciones post-traduccionales necesarias para que la proteína se exprese en su forma nativa. Al mismo tiempo, permite la fácil manipulación de la secuencia *in vitro* para generar mutaciones beneficiosas o contrarrestar la deriva antigénica característica especialmente de ciertos tipos de virus. El hecho de poder administrar simultáneamente varios vectores, sin que haya interferencia entre los mismos, que de lugar a varias inmunizaciones simultáneas también supone una gran ventaja [3]. En cuanto a la respuesta inmunitaria inducida, los péptidos codificados en el vector pueden ser presentados tanto por el MHC de clase I como por el de clase II, lo que estimula a los linfocitos Th1 y Th2 y por ende, a las células B [1]. El potencial de integración en el genoma del hospedador, que podría dar lugar a mutagénesis por inserción, y la baja inmunogenicidad inducida suponen los principales inconvenientes de este tipo de vacunas [2].

2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA VACUNA

Se han propuesto tres mecanismos diferentes por los cuales el antígeno codificado por la vacuna puede inducir la respuesta inmunitaria. Por un lado, estos péptidos son presentados a los linfocitos T_c, mediante el MHC de clase I, por las células somáticas que han incorporado el plásmido. Por otro lado, si el vector es incorporado por células presentadoras de antígeno (APC-Antigen Presenting Cell), expresarán la proteína y activarán a los linfocitos T. Por último, las APCs pueden fagocitar células somáticas transfectadas con la vacuna y presentar el antígeno mediante el MHC de clase II a las células T [1].

La baja expresión del antígeno inyectado mediante la vacuna de ADN puede mejorar la respuesta inmune adaptativa en comparación con la corta vida media de las vacunas inactivadas o subunidad. Sin embargo, este sistema no conduce a una buena inducción de la inmunogenicidad y para potenciar ésta respuesta se utilizan inmunostimulantes de ADN plasmídico. Un ejemplo de ellos son los motivos CpG no metilados característico de bacterias, que permite la identificación de éste ADN como extraño o asociado a patógeno. En general, estos motivos llevan a la activación del sistema inmune mediante su unión a receptores tipo Toll (TLR- Toll Like Receptor), en especial TLR-9. Otros estudios también han mostrado que la quinasa de unión a TANK 1 (TBK1) puede ser utilizada como adyuvante en estas vacunas. TBK1 fosforila tanto a IRF3 como a IRF7, activando la vía de transcripción de los genes de interferón tipo I. El ADN citoplasmático también puede activar, entre otros factores, AIM2 y STING, que conducen a la inmunidad innata [1].

3. MECANISMOS DE ADMINISTRACIÓN

Entre los problemas asociados a las vacunas de ADN cabe destacar por su importancia la eficacia de transfección. Uno de los métodos utilizado para introducir el ácido

nucleico en el interior celular es la inyección del plásmido desnudo vía intradérmica o intramuscular. Sin embargo, ésta técnica es poco eficiente ya que sólo una baja fracción del material inyectado es asimilada y expresada por las células. Además, aunque pueden inducir respuestas inmunes sistémicas, no generan respuesta inmune mucosal, que parece proporcionar un mayor nivel de protección probablemente porque es la vía de entrada de la mayoría de los patógenos y limitará más eficientemente la propagación de la infección. Un método alternativo consiste en la administración del ADN en nanopartículas, que evitarían su degradación y favorecerían su captación por las células presentadoras de antígenos. También es posible la entrega del plásmido recubierto con partículas de oro, mediante lo que se conoce como pistola génica, que los dirige a las células de Langerhans y a otras APCs profesionales [3]. No obstante, ésta última técnica no es muy efectiva ya que la dosis que se puede suministrar es muy limitada y se requieren múltiples disparos para una inmunización efectiva [1].

Es posible utilizar bacterias atenuadas como vehículos para proporcionar el vector a las células presentadoras de antígenos, las cuales fagocitarán y lisarán a estos microorganismos liberando el plásmido en su interior celular. La vacuna no ha de ser degradada en el del fagosoma, por lo que suelen emplearse bacterias que expresen listeriolisina, que les permite escapar de estos orgánulos, u otras con características similares para así evitar la degradación del vector. Además del uso de bacterias y de la pistola génica anteriormente mencionadas, se han diseñado sistemas de entrega no invasivos basados en lípidos o carbohidratos [3].

La mejora más significativa entre los sistemas de transfección para la entrega de la vacuna de ADN ha sido la electroporación, que permite una transformación eficiente de las células *in vivo* y favorecen la inflamación local, mejorando la respuesta inmunológica. Esta metodología propone un nuevo enfoque para aumentar la efectividad de estas vacunas, aunque el principal inconveniente para su aplicación está en la poca tolerancia a la técnica [1].

4. VACUNAS CONTRA EL CÁNCER

Las células del organismo mantienen un equilibrio entre proliferación y apoptosis que está controlado por un complejo sistema de regulación, implicando a múltiples proteínas y moléculas de adhesión que garantizan la respuesta celular a las señales fisiológicas. La pérdida de este equilibrio resulta en una división celular descontrolada que puede dar lugar a cáncer, ocasionado por mutaciones o reordenamientos del ADN. En ocasiones estas modificaciones pueden llevar a la aparición de antígenos asociados a tumores (TAA-Tumor Associated Antigens) que pueden ser reconocidos por el sistema inmune, induciendo la respuesta celular, iniciada por las células presentadoras de antígenos. Estas células estimularán a los linfocitos Th y desencadenarán la producción de anticuerpos por los linfocitos B [2]. En este punto, el objetivo consiste en desarrollar vacunas terapéuticas presentando epítopos asociados a tumores que sean capaces de activar al sistema in-

mune. Los primeros intentos trataban de inducir la respuesta inflamatoria mediante el uso de adyuvantes, aunque no se obtuvieron muy buenos resultados. Las proteínas oncovirales, mutadas, antígenos de diferenciación o antígenos asociados a tumores son capaces de iniciar la respuesta inmunitaria y constituyen una buena diana para el diseño de vacunas anticancerígenas. Aunque el diseño de vacunas dirigidas a proteínas mutadas puede resultar difícil, por tratarse de modificaciones específicas del paciente, sería posible centrarse en el estudio de los TAA. Así, actualmente se trata de estimular la respuesta celular mediante un mejor conocimiento de los TAA. Este tipo de epítomos pueden ser resultado de la activación de genes que permanecen silenciados en las células adultas normales, como es caso de los genes oncofetales; o de la desmetilación de secuencias del ADN, como por ejemplo los genes *MAGE*, transcripcionalmente reprimidos pero que se expresan en células cancerígenas [2]. El desarrollo de estas vacunas iría dirigido a la identificación de antígenos específicos tumorales capaces de inducir la respuesta del sistema inmunológico.

5. EPIGENÉTICA EN EL DISEÑO DE VACUNAS

La epigenética, constituye el mecanismo hereditario que afecta al estado transcripcional de un gen de forma distinta a cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN. Pueden afectar a modificaciones en las histonas, metilaciones, remodelación de la cromatina, ARN de interferencia (ARNi) y ARNs no codificantes [1]. Diversos trabajos, como los realizados por Cuaddapah et al. [4] o Golberg et al. [5], han demostrado que la epigenética parece estar involucrada en la función del sistema inmune y puede ser una herramienta útil para el desarrollo de vacunas de ADN más potentes, ya que la expresión de los genes portados en los plásmidos de estas vacunas están sometidos a los mismo efectos de silenciamiento. Los vectores episomales originados en bacterias tienen una serie de elementos que son objeto del silenciamiento transcripcional y como consecuencia de la disminución de la expresión de los antígenos in vivo, que parece asociarse fundamentalmente con modificaciones en las histonas. Además, diversos estudios han mostrado que la liberación de histonas en tejidos dañados puede mediar la muerte celular activando a los receptores TLR2 y TLR4. Así, en el diseño de estas vacunas, el ADN plasmídico puede ser reconstruido con modificaciones activas en las histonas que aumenten el nivel de expresión del antígeno y logre una mayor respuesta inmune [1].

6. RNAi EN EL DISEÑO DE VACUNAS DE ADN

El ARN de interferencia (ARNi) consiste en una pequeña molécula de ARN que suprime la expresión génica por silenciamiento post-transcripcional, mediante la formación de estructuras bicatenarias con otras moléculas de ARN. Actualmente están siendo utilizados en aplicaciones terapéuticas y en el desarrollo de vacunas de ADN. El uso de ARNi en el diseño de vacunas está relacionado con el bloqueo de los genes que suprimen su acción, como el bloqueo de la caspasa 12 (Casp12), que induce la muerte

celular tras la vacunación mediante la activación de ciertos factores, linfocitos Tc y producción de anticuerpos. También pueden ser utilizados para bloquear la expresión de genes inmunosupresivos que inhiben la respuesta a las vacunas, como es el caso de Foxo3. Éste factor actúa reduciendo la proliferación de las células T, por lo que su depleción mediante ARNi puede incrementar la eficacia de las vacunas de ADN, como se ha probado en el caso de vacunas contra el cáncer dirigida a HER-22/neu. Así, es posible incluir ARNis en el diseño de vacunas de ADN para mejorar su efecto sobre el organismo, ya sea inhibiendo rutas apoptóticas o genes inmunosupresores. No obstante, la seguridad del uso de estas moléculas en vacunas de ácidos nucleicos aún no se ha demostrado, siendo necesario una mayor investigación en este área [1].

7. CONCLUSIONES

Hay que destacar que la inmunogenicidad inducida por las vacunas de ADN es limitada debido a los bajos niveles de expresión del antígeno, en comparación con las vacunas convencionales [1]. No obstante, en la actualidad se están desarrollando nuevos métodos y técnicas para favorecer la entrega del ácido nucleico a las células presentadoras de antígeno y así activar al sistema inmunológico, como es el caso de la electroporación, la pistola génica o la entrega basada en lípidos.

Las investigaciones actuales relacionadas con el desarrollo de vacunas no sólo están dirigidas al diseño de vacunas preventivas sino también a aquellas de carácter terapéutico. Esto ha llevado a ampliar el área de aplicación y desarrollo de las mismas y a la búsqueda de posibles dianas en enfermedades como el cáncer. Por tanto, se trata de una nueva vía de desarrollo con muchas perspectivas futuras. Del mismo modo, los conocimientos sobre el mecanismo de silenciamiento del ARN de interferencia o la epigenética constityen nuevas alternativas para la síntesis de vacunas más fuertes y efectivas, que induzcan una mayor respuesta inmunitaria. Así, más de veinte años después de su descubrimiento y de los ensayos llevados a cabo con las vacunas de primera y segunda generación, las vacunas de ADN están experimentando un renacimiento gracias al desarrollo de diseños más eficientes [1].

REFERENCIAS

- [1] Lee, L., Saade, F., Petrovsky, N., "The future of human DNA vaccines". *Journal of Biotechnology*, vol. 162, pp. 171-182. September 2012.
- [2] Berthet, F.-X., Coche, T., Vinals, C. "Applied genome research in the field of human vaccines" *Journal of Biotechnology*, vol. 85, no. 2001, pp.213-226, May 2000.
- [3] Baca-Estrada, M. E., Foldvari, M., Babiuk, S.L., Babiuk, L.A. "Vaccine delivery: lipid-based delivery systems" *Journal of Biotechnology*, vol. 83, no. 1-2, pp.91-104, September 2000.
- [4] Cuddapah, S., Barski, A., Zhao, K. "Epigenomics of T cell activation, differentiation, and memory". *Current Opinion in Immunology*, vol. 22, no. 3, pp. 341-347, June 2010.
- [5] Goldberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E. "Epigenetics: a landscape takes shape". *Cell*, vol. 128 4, no., pp. 635-638, February 2007.



Cristina Mesa Núñez estudiante de quinto curso de la Licenciatura en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide, promoción 2008-

2013. Desde 2010 trabaja como alumna interna en el Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular con el Dr. Carlos Santos Ocaña. Actualmente es secretaria de la Asociación Biotecnólogos de Andalucía (AsBAN) y forma parte de la organización del *Biotech Annual Congress, Sevilla 2013*.

El uso de nanopartículas para la mejora y optimización de vacunas

Álvaro Muñoz López

Resumen—La Nanotecnología es una nueva ciencia en auge cuyo desarrollo ha posibilitado su aplicación a múltiples áreas. En el campo de la Inmunología, el desarrollo de nanopartículas está permitiendo la mejora y optimización de las vacunas mediante el uso de diversas estrategias. En este artículo revisaremos aquellas más prometedoras que se están investigando en la actualidad, destacando sus múltiples ventajas.

Palabras Claves— Nanopartículas, vacunas, nanotecnología, inmunología, inmunoterapia.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la Nanotecnología ha permitido la creación de nuevos materiales con muy variadas propiedades fisicoquímicas y formas, generando un sinnúmero de aplicaciones en distintos campos como la Informática, la Electrónica y la Biomedicina, así como en todo tipo de industrias. Entre sus aplicaciones más prometedoras que aún se encuentran en fase de investigación podemos encontrar el almacenamiento, producción y conversión de energía, el tratamiento y remediación de aguas y aire, el desarrollo de componentes electrónicos, la producción de nuevos materiales de construcción, el diagnóstico y cribado de enfermedades y su uso como sistema de administración de fármacos. Ésta última aplicación mencionada tiene una relación directa con el uso de la Nanotecnología para la mejora, optimización y desarrollo de vacunas. Las investigaciones actuales en este campo se centran en tratar de superar algunas de las limitaciones de las vacunas que hacen que éstas sean menos efectivas, mediante la utilización de nanopartículas que favorecen una mejor recogida del antígeno por las células presentadoras de antígenos, una reducción de la cantidad de adyuvantes y un aumento de la respuesta inmunológica [1].

2. UTILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS PARA LA MEJORA DE VACUNAS

2.1. Propiedades de interés de las nanopartículas

Las nanopartículas poliméricas presentan una serie de características de interés desde el punto de vista farmacéutico que hacen que sean de especial utilidad en el

desarrollo de vacunas. En primer lugar, son más estables que otros transportadores coloidales, como los liposomas, por lo que pueden proteger el antígeno encapsulado de posibles degradaciones, especialmente si son administrados oralmente. Por otra parte, el uso de distintos materiales poliméricos permite modular características fisicoquímicas como la hidrofobicidad con el fin de mejorar la eficiencia, la tasa de liberación del antígeno y el comportamiento biológico de las nanopartículas. Además es posible modificar su superficie para dirigir las específicamente a ciertos órganos o tipos celulares, así como para mejorar la recogida de las nanopartículas por parte de las células presentadoras de antígeno. Otra importante ventaja se debe a su pequeño tamaño y a su gran relación área/volumen que favorecen su absorción en comparación con la de otros transportadores de mayor tamaño. [2]

Otras propiedades de interés de las nanopartículas a tener en cuenta para su uso en vacunas es que éstas deben ser biodegradables y biocompatibles para que no provoquen efectos perjudiciales para la salud del paciente. [3]

2.2. Tipos de nanopartículas y su composición

Las nanopartículas son transportadores coloidales cuyo tamaño oscila entre 10 y 1000 nm y que se clasifican en dos categorías: nanocápsulas y nanoesferas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares formados por una pared polimérica y un interior o núcleo hueco que puede contener un medio acuoso u oleoso. Por otra parte, las nanoesferas consisten en una matriz polimérica generalmente esférica. El uso de un tipo u otro de nanopartícula de-

pendará principalmente de la naturaleza del antígeno que portarán [2].

También es importante destacar que los polímeros que constituyen las nanopartículas pueden formularse con distintos compuestos, lo que determinará el tamaño de las nanopartículas y sus propiedades fisicoquímicas, así como su tasa de biodegradación y liberación del antígeno. Además, pueden estar formadas tanto por polímeros sintéticos como naturales. Generalmente los polímeros naturales permiten una rápida liberación de su contenido, mientras que los polímeros sintéticos permiten una liberación más prolongada y duradera durante periodos de tiempo que oscilan entre días y varias semanas, motivo por el cual los polímeros sintéticos son más utilizados en el desarrollo de vacunas [2].

Los polímeros naturales más usados para la formulación de nanopartículas son aquellos constituidos por albúmina, gelatina, alginato, colágeno y quitosán o quitosano. Este último compuesto es el que parece tener unas propiedades más prometedoras debido a su habilidad para potenciar la permeabilización y recogida por las células [2].

En cuanto a los polímeros sintéticos, los más empleados para la formulación de nanopartículas son poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico - co - glicólico) (PLGA), poli (ϵ - caprolactona) (PCL), poli (metil metacrilatos) y poli (alquil cianoacrilatos) [2]. De todos estos polímeros, los más usados en la aplicación de la Nanotecnología a las vacunas son los PLGA y los PLA, especialmente los primeros [4]. Entre sus ventajas y propiedades más atractivas de cara a su aplicación clínica encontramos su biodegradabilidad y biocompatibilidad, el hecho de que han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) y la Agencia Europea de Medicina para su uso como sistema de envío de fármacos por vía parenteral y que sus métodos de producción están bien estandarizados. Además, protegen al antígeno contra la degradación, permiten una liberación prolongada del mismo y su superficie puede ser modificada con relativa facilidad para mejorar su interacción con materiales biológicos, así como para dirigir las nanopartículas específicamente hacia órganos y células de interés [4].

2.3. Uso de nanopartículas como sistema de envío de vacunas

Las nanopartículas permiten englobar todo tipo de antígenos como proteínas, péptidos, lipopéptidos, lisados celulares, virus o ADN, por lo que su aplicación en el desarrollo de vacunas es muy prometedora. Diversos estudios han demostrado que la utilización de nanopartículas como sistema de envío de vacunas permite potenciar la recogida tanto de los antígenos como de los adyuvantes por parte de las Células Presentadoras de Antígeno (APCs), lo que da lugar a una mayor y mejor respuesta inmune. También la liberación prologanda de los antígenos puede ayudar a desencadenar una respuesta inmune

más efectiva, así como evitar el riesgo de tolerancia al antígeno, por lo que permitiría prescindir de la necesidad de varias dosis para producir una inmunidad protectora a largo plazo [4].

El uso de nanopartículas permite englobar los antígenos y los adyuvantes dentro de una misma partícula, así como una combinación de varios antígenos. Esta ventaja es muy importante, ya que se ha demostrado que los antígenos y los adyuvantes deben ser co-enviados dentro de la misma partícula de forma que ambos puedan ser internalizados en la célula simultáneamente, dando lugar a una mejor activación del sistema inmune, incluso con una menor concentración de antígeno y adyuvantes. El uso de concentraciones más bajas es una importante ventaja, ya que permite minimizar los efectos adversos asociados al uso de adyuvantes, así como reducir los costes de producción de la vacuna [4].

Por otra parte, también se ha demostrado que las nanopartículas tienen una capacidad especial para activar la presentación de antígenos mediante MHC de clase I tras su internalización por células dendríticas. Esto es fundamental para estimular a los linfocitos T CD8⁺ y que adquieran su capacidad citotóxica para llevar a cabo la respuesta inmune celular [4].

2.4. Modificación de nanopartículas para favorecer su interacción con células del sistema inmune

Para fomentar la interacción de las nanopartículas con las células del sistema inmune generalmente se añaden a la superficie de las partículas ligandos dirigidos hacia receptores de membrana de las células de interés. Actualmente, se está estudiando el uso de ligandos de muy diverso origen como péptidos, anticuerpos, proteínas, polisacáridos, glicolípidos, glicoproteínas y lectinas para dirigir las nanopartículas específicamente hacia células del sistema inmune. Además, en este proceso también influyen las propiedades fisicoquímicas como el tamaño, la forma, la carga de la superficie y la hidrofobicidad de la nanopartícula, por lo que será muy importante ajustarlas para favorecer su recogida e internalización por parte de las APCs [4].

El tamaño de la nanopartícula es una de las características más importantes que se deben controlar para garantizar una correcta internalización por parte de las células de interés. Sin embargo, todavía no se ha podido determinar el tamaño óptimo de las mismas. Teniendo en cuenta que las APCs pueden procesar antígenos mediante la internalización de patógenos, cuyo tamaño oscila entre el de un virus y una bacteria, incluso algunas células, sería lógico pensar que las nanopartículas cuyo tamaño sea similar al de estos patógenos podrán ser correctamente internalizadas. Además, a pesar de que las APCs pueden captar nanopartículas en sitios periféricos como la epidermis y la dermis, se ha demostrado que es mucho más ventajoso dirigir las nanopartículas específicamente a los ganglios linfáticos, ya que de este modo las células dendríticas re-

sidentes madurarán *in situ*, mientras que si las nanopartículas son internalizadas por APCs periféricas, éstas deberán migrar a los ganglios linfáticos, proceso que dura aproximadamente 24 horas. En estos casos, a la hora de diseñar las nanopartículas es esencial tener en cuenta que los vasos linfáticos tienen un diámetro de 10 – 60 μm y los vasos sinusoides del bazo de 150 – 200 nm. Por tanto, el tamaño deberá oscilar entre los rangos mencionados [4].

En cuanto a la adición de ligandos a la superficie de las nanopartículas podemos destacar dos ventajas principales. Por una parte, permite direccionar las partículas específicamente hacia determinados tipos celulares que presenten un determinado receptor de membrana como las células dendríticas, de forma que se potencia la internalización los antígenos. Por otra parte, el reconocimiento de determinados ligandos por parte de las APCs puede potenciar la inmunogenicidad de este tipo de vacunas, gracias a que proporcionan una “señal de peligro o estrés” intrínseca que inducen la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa [4].

Las APCs presentan un amplio abanico de receptores de membrana en su superficie conocidos como Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) que están involucrados en la iniciación y ejecución de la respuesta inmune. Entre ellos encontramos los Receptores tipo Toll (TLRs), los receptores tipo NOD, receptores inducibles por ácido retinoico (RLR) y los receptores de lectinas tipo C (CLRs). Muchos de estos receptores son capaces de reconocer ligandos de patógenos conocidos como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), por lo que su estudio es fundamental en el desarrollo de vacunas. Básicamente, cuando se reconoce un PAMP mediante un PRR se produce la activación de las APCs desencadenando una cascada de señalización intracelular que da lugar a la inducción de citoquinas inflamatorias, quimiocinas, interferones y a la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras fomentando la proliferación, activación y maduración de linfocitos T y B. Por este motivo, se está estudiando el efecto de la adición a la superficie de las nanopartículas de ligandos para estos receptores [4].

Siguiendo la estrategia mencionada, algunos estudios han demostrado que la adición de una polimánosa natural a la superficie de las nanopartículas incrementa la afinidad de unión y mejora la respuesta de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, gracias a la interacción del ligando con el receptor de manosa MR/CD206. Otros estudios han pretendido dirigir las nanopartículas hacia células dendríticas usando ligandos del receptor específico DC – SIGN, que es un receptor de lectinas de tipo C. Como ligando se usaron glicanos de manosa y antígenos de tipo Lewis presentes en patógenos como el HIV y *Micobacterium*. Los resultados demostraron que las nanopartículas con estos ligandos eran capaces de mejorar la respuesta dependiente de linfocitos T entre 10 y 100 veces más, incluso con menor concentración de partículas. Asimismo, se están realizando investigaciones con muchos tipos distintos de ligandos y antígenos con el fin de dirigir las nanopartículas contra tipos celulares especí-

ficos, así como para mejorar su internalización [4].

Otra prometedora diana a la que dirigir las vacunas basadas en nanopartículas son las células NK, ya que son un puente efectivo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Existe un gran número de antígenos lipídicos y glicolipídicos que pueden unirse al receptor CD1d y activar las células NK, por lo que la mayoría de estrategias consiste en utilizar dichos antígenos. El antígeno que mejores resultados ha dado hasta el momento es una α – galactosilceramida, KR70000, permitiendo la activación de células NK tanto *in vitro*, como *in vivo* [4].

3. CONCLUSIONES

El desarrollo de vacunas basadas en nanopartículas es una aplicación terapéutica muy prometedora, gracias a las numerosas ventajas que presentan este tipo de vacunas, así como a la posibilidad de superar las limitaciones de las vacunas actuales. Las nanopartículas son biodegradables y biocompatibles, pueden ser dirigidas específicamente y sus propiedades fisicoquímicas pueden ser fácilmente adaptables para garantizar una adecuada internalización por parte de las APCs. Además, su eficiencia para desencadenar la respuesta inmune permite reducir la cantidad de adyuvantes necesarias, de forma que se minimizan los efectos adversos asociados a la vacuna. Por último, es importante destacar que la capacidad protectora de las nanopartículas de los antígenos que portan hace que se valoren como un potencial sistema para el desarrollo de vacunas orales. Este tipo de vacunas está siendo cada vez de mayor interés gracias a las ventajas que presenta por implicar una forma de administración mucho más fácil y no invasiva, así como por prevenir contaminaciones. [2]

A pesar de todas estas importantes y prometedoras ventajas, aún queda un largo camino por recorrer para su aplicación clínica, por lo que las investigaciones que se realicen en este campo en los próximos años serán fundamentales para garantizar el éxito de este tipo de vacunas.

REFERENCIAS

- [1] David Gómez et al. “Aplicaciones industriales de la nanotecnología.” Proyecto NANO – SME. Fundación ITMA, Universidad de Oviedo, INCAR (CSIC).
- [2] A. des Rieux, V. Fievez, M. Garinot, Y.J. Schneider, V. Pr at, “Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach.” *Journal of Controlled Release*, 116, 1 – 27, 2006.
- [3] T. Akagi, X. Wang, T. Uto, M. Baba, M. Akashi, “Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly (amino acid) derivatives”. *Biomaterial* 28, 3427 – 3436, 2007.
- [4] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Pr at. “PLGA – based nanoparticles: An overview of biomedical applications”. *Journal of Controlled Release*, 161, 305 – 522, 2012.



Álvaro Muñoz López estudiante de 5º de Licenciatura en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide (UPO), miembro de la Junta Directiva de la Asociación de Biotecnólogos de Andalucía (AsBan) y alumno interno en el

Departamento de Genética. Anteriormente ha colaborado en el Departamento de Virología de la Universidad de Nuevo México, en el área de Neurociencias de la UPO, en el Departamento de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Cabimer y en la unidad de Vectores Virales del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

Vacunas comestibles

Marta Toledano Fonseca

Resumen—Las vacunas comestibles son producidas en plantas transgénicas, y esto permite que puedan servir para casos de vacunaciones masivas o en países en vías de desarrollo de forma mucho más eficaz, puesto que son más asequibles desde el punto de vista económico y más fáciles de transportar y mantener que el resto de vacunas. Si bien todavía está en fase de investigación, las grandes ventajas que presentan las convierten en una opción llamativa para seguir con ello. Aún así, hay que resolver una serie de problemas que no permitirían obtener toda la eficiencia posible de la vacuna.

Palabras Claves— Vacuna comestible, Planta transgénica, Transformación.

1. INTRODUCCIÓN

Para la comprensión de este artículo lo primero que debemos recordar es qué es una vacuna.

Una vacuna es un preparado de antígenos que una vez dentro del organismo provoca la producción de anticuerpos y con ello una respuesta de defensa ante el organismo. [1]

La vacunación es una forma muy importante de erradicar las enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales, más aún actualmente con el aumento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos y la aparición de patógenos nuevos y reemergentes. [3]

Las vacunas que se utilizan habitualmente son las vacunas atenuadas, las inactivadas o por subunidades, aunque en los últimos años se están estudiando las vacunas basadas en la tecnología del ADN recombinante. Además de estos tipos hay algunas vacunas que aún se siguen estudiando como una gran apuesta de futuro y que no deben dejarse de lado debido a los beneficios que podrían aportar, éstas son las vacunas comestibles, y son las que se van a analizar en este artículo.

2. VACUNAS COMESTIBLES

2.1. Fundamento de las Vacunas Comestibles

El fundamento de las vacunas comestibles se basa en la introducción en plantas, mediante técnicas de ingeniería genética, de un gen que lleva la información necesaria para producir en su interior una proteína antigénica. [8]

Las plantas se están utilizando como una alternativa, no sólo para expresar y fabricar una amplia gama de proteínas exógenas que pueden ser usadas como inmunógenos, sino que son en sí mismas una forma de administra-

ción oral. [2]

Lo primero que se tiene que conseguir es la planta transgénica, capaz de dar lugar a vacunas comestibles. Para ello, los pasos que han de seguirse serán los siguientes: [1]

1. Identificación de la proteína de interés inmunológico para la salud humana o animal.
2. Aislar el fragmento de ADN que codifica para dicha proteína.
3. Insertar el fragmento de ADN en un plásmido que

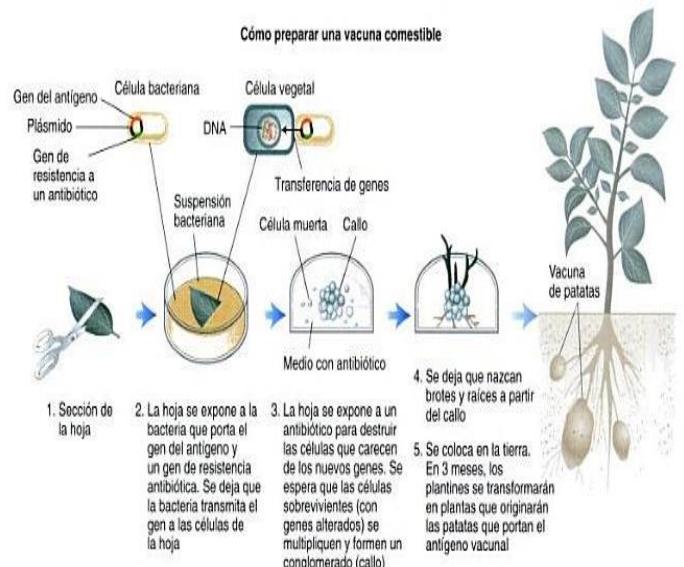


Fig. 1. Ejemplo de cómo preparar una vacuna comestible. Adaptado de W.H.R Langridge, Sci. Am. (2000).

hace de vector de transferencia.

4. Introducir el plásmido en un vector de expresión, como puede ser una bacteria.
5. Cultivar los vectores de expresión y las células vegetales.
6. Cultivar la planta modificada genéticamente.

La transformación de la célula vegetal se puede lograr por métodos directos de transferencia de genes como electroporación mediante el uso de un portador (biobalística o microinyección), el uso de tratamiento con polietilenglicol o el empleo de vectores biológicos como *Agrobacterium*. Este último método es el que más se está empleando hoy día en los estudios de vacunas comestibles, puesto que es el más simple y permite la introducción de grandes fragmentos de ADN, además de hacerlo con una mayor eficiencia y un menor coste.

Utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium*, se han diseñado plantas transgénicas para expresar una amplia variedad de proteínas exógenas, que se pueden usar para la producción de vacunas. Hasta la fecha, se han producido las proteínas clínicamente más relevantes en la planta del tabaco, aunque también se ha conseguido en las plantas de patata, alfalfa, soja, arroz y trigo.

Hay que tener en cuenta que en las plantas, mientras que el tejido verde tiene una clara ventaja en términos de productividad, las semillas o los tubérculos son más útiles para el suministro de un producto comestible, tal como una vacuna, ya que pueden ser almacenados durante largos períodos de tiempo y enviados a largas distancias a temperatura ambiente. [4]

La inmunización oral se ha conseguido en algunos casos, por ejemplo, se ha introducido el gen HBsAg, que es el antígeno de superficie de la hepatitis B, en el T-DNA de *Agrobacterium* y se han transformado distintas especies vegetales. Se han usado entre otras: el tabaco, ya que no es un cultivo alimentario, y de esta manera podemos obtener proteínas recombinantes sin el riesgo de entrar en la cadena alimentaria. Además, las hojas de tabaco se utilizan antes de la floración, con lo que también reducimos la posibilidad de la pérdida o propagación de genes en el medio ambiente a través del polen o la dispersión de las semillas. Lo que se ha hecho es transformar mediante *Agrobacterium* y así se obtienen plantas de tabaco que proporcionaban actividad inmunológica frente a la hepatitis B.

También se ha realizado con éxito la transformación en la patata, el problema es que los tubérculos de la patata no se pueden comer crudos, y en el proceso de cocción una gran cantidad de las proteínas del antígeno podrían ser destruidas y dar lugar a una reducción importante en la actividad inmunológica del antígeno HBsAg. Se ha probado también en el tomate, ya que éste sí se puede comer crudo, de hecho es el que se está utilizando para los estudios en los últimos años ya que es el material ideal para esto. [6]

A pesar de estos éxitos, hay que señalar que no existen productos farmacéuticos transgénicos derivados de plantas en la producción comercial. Esto puede cambiar en un

futuro próximo, de hecho, se ha creado un consorcio europeo con colaboradores en Sudáfrica, denominado Pharma-Planta, que participan en desarrollar plataformas de plantas transgénicas para la producción de productos farmacéuticos dirigidos al VIH, la rabia, la tuberculosis y la diabetes. Este grupo sería el primero en llevar a cabo ensayos clínicos de fármacos de origen vegetal dentro del marco de regulación de la Unión Europea.

2.2. Ventajas de las Vacunas Comestibles

Las principales ventajas se deben al hecho de utilizar plantas para su producción, ya que:

- d. Las plantas para son sistemas de producción económicos y fáciles de mantener, puesto que no requieren de materiales caros para su crecimiento.
- e. Es difícil que se contaminen con patógenos que afectan a mamíferos. [2]
- f. Pliegan y ensamblan las proteínas recombinantes utilizando chaperonas que son homólogas a las de células de mamífero, y realizan modificaciones post-traduccionales. En las plantas, la glicosilación se diferencia de los mamíferos en los glicanos complejos, pero de las proteínas recombinantes expresadas hasta el momento, esto no ha conducido a la pérdida de la estructura ni de la función. [5]
- g. Puede ser una promesa considerable para el mundo en desarrollo, donde la refrigeración, jeringuillas, agujas estériles, y personal capacitado es escaso. [5]

2.2. Inconvenientes de las Vacunas Comestibles

El principal problema es que los antígenos que están en los alimentos pueden sufrir una degradación en el estómago e intestino antes de inducir la respuesta inmune. Este es el motivo por el que las vacunas comestibles solo pueden ser consumidas en su forma fresca. Además, deben contener una gran cantidad de antígeno para que la vacunación sea efectiva y que no sea necesario consumir grandes cantidades de alimento.

Estas vacunas comestibles pueden producir reacciones alérgicas si tanto los humanos como otros animales se exponen de forma repetida al alérgeno.

También hay que tener en cuenta, que las vacunas en los alimentos pueden contaminar rápidamente cultivos que son utilizados como alimentos exclusivamente. Los cultivos modificados para producir dichas vacunas deberían estar restringidos, para evitar su fácil propagación, y por tanto, se debe regir por unas estrictas medidas de confinamiento. [7]

En la actualidad lo que se están estudiando son sobre todo cultivos de frutas, como los plátanos o de cereales. [8]

3. CONCLUSIONES

Las vacunas comestibles aún requieren algunas mejoras en la expresión de los antígenos en la planta o en la protección de los antígenos frente a la degradación gastrointestinal [8], pero las ventajas que poseen con respecto al resto de vacunas hace que sea necesario seguir estudian-

do en esta dirección.

Además, la simplicidad de su producción, manipulación y administración las hace atractivas para el desarrollo de vacunas asequibles, sobre todo para los países en desarrollo y en casos de vacunación masiva. [2]

REFERENCIAS

- [1] Wikipedia: <http://es.wikipedia.org/wiki/Vacuna>(Enlace web)
- [2] Gómez, Evangelina, "Plant-based vaccines for potential human application," *Human Vaccine*, vol. 5, no. 11, pp. 738-744, Nov 2009.
- [3] Schuyler S. Korban, "Foods as Production and Delivery Vehicles for Human Vaccines", *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 21, no. 3, pp. 212-217, 2002.
- [4] P. Rybicki, Edward, "Plant-produces vaccines: promise and reality", *Drug Discovery Today*, vol. 14, no. 1/2, pp. 16-24, Jan 2009.
- [5] K-C. Ma, Julian, "Antibody processing and engineering in

plants, and new strategies for vaccine production", *Vaccine*, vol. 23, pp. 1814-1818, 2005.

- [6] Guan, Zheng-jung, "Overview of expresión of hepatitis B surface antigen in transgenic plants", *Vaccine*, vol. 28, pp. 7351-7362, 2010.
- [7] Martin Khor et al, "Resurgence en español", Icaria Editorial, pp.117-119.
- [8] López, Marta, "Vacunas de nueva generación", *Genoma España*, Sep 2004.



Marta Toledano Fonseca. Quinto de licenciatura de Biotecnología, Universidad Pablo de Olavide, 2013.

Fármacos comerciales contra el SIDA y sus dianas específicas

Yolanda Elizabeth González Flores

Resumen— Las terapias antiretrovirales han supuesto un gran avance en la lucha contra el SIDA. Los medicamentos desarrollados hasta el momento se dirigen hacia diferentes dianas: la fusión y entrada del virus, la retrotranscriptasa, la integrasa y la proteasa. En este artículo se dará una visión general de los fundamentos de los distintos tipos de fármacos y algunos ejemplos de los mismos.

Palabras Claves— Fármaco, inmunodeficiencia, maraviroc, SIDA, VIH.

1. INTRODUCCIÓN

Las terapias antiretrovirales (ART) han supuesto un gran avance en la lucha contra el SIDA, hasta el punto de que una combinación de ART apropiada y su uso generalizado en los países desarrollados a mitad de los años 90 hizo descender las muertes de personas con VIH en 2/3 entre 1995 y 1997. Más aún la esperanza de vida de las personas con SIDA gracias a las ART ha aumentado de 10.5 años en el 96, a 22.5 años en el 2005 y actualmente se estima que se está aproximando al de la población general [1].

En la actualidad existen 30 medicamentos comerciales, como se puede observar en la Tabla 1, algunos de ellos

compuestos por un solo fármaco y otros por una combinación de ellos. Además, como ahora veremos, estos fármacos se clasifican en función de la diana a la que afecten: inhibidores de la retrotranscriptasa nucleosídicos/nucleotídicos o no nucleosídicos, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la integrasa, inhibidores de la fusión y entrada y regímenes de comprimido único. En este artículo se dará una explicación de las distintas dianas contra las que se dirigen los medicamentos contra el VIH [2].

TABLA 1
MEDICAMENTOS COMERCIALES CONTRA EL SIDA

Inhibidores de la retrotranscriptasa nucleosídicos/nucleotídicos	Prezista (darunavir)
Combivir (zidovudina+lamivudina)	Reyataz (atazanavir)
Emtriva (emtricitabina)	Virecept (nelfinavir)
Inhibidores de la retrotranscriptasa no-nucleosídicos	
Epivir (lamivudina)	Edurant (rilpivirina)
Epzicom (abacavir+lamivudina)	Intelence (etravirina)
Retrovir (zidovudina)	Rescriptor (delavirdina)
Trizivir (abacavir+zidovudina+lamivudina)	Sustiva (efavirenz)
Truvada (tenofovir+emtricitabina)	Viramune XR (nevirapina)
Videx EC (didanosina)	Inhibidores de la integrasa
Viread (tenofovir)	ISENTRES (raltegravir)
Zerit (estavudina)	Inhibidores de la fusión y entrada
Ziagen (abacavir)	Fuzeon (enfuvirtida)
Inhibidores de la proteasa	Selzentry (maraviroc)
Aptivus (tipranavir)	Regímenes de comprimido único
Crixivan (indinavir)	Atripla
Invirase (saquinavir)	(efevirenz+tonofovir+emtricitabina)
Kaletra (lopinavir)	Completra
Lexiva (fosamprenavir)	(rilpivirina+tenofovir+emtricitabina)
Norvir (ritonavir)	

Clasificación de los medicamentos contra el SIDA actuales y los fármacos que los componen entre paréntesis [2].

2. TIPOS DE MEDICAMENTOS Y SUS DIANAS

2.1. Inhibidores de la entrada del virus

En primer lugar los inhibidores de la entrada del virus, como el Fuzeon y el Selzentry impiden la entrada del virus en su célula diana, los linfocitos T helpers o coadyuvantes, una células fundamentales del sistema inmune. El VIH, o virus del SIDA, necesita unirse a los receptores CD4 que se encuentran en la superficie de estos linfocitos para poder penetrar en ellos. Estos medicamentos se unen a los receptores CD4, impidiendo, por tanto, que el VIH pueda unirse a ellos. Por otro lado, para la entrada del VIH, además de los receptores CD4 son imprescindibles los correceptores CXCR4 y/o CCR5, por lo que hay medicamentos que se encargan de bloquear estos correceptores. Finalmente, la proteína de la cápsida (cubierta proteica) del virus que reconoce a los receptores CD4 es la gp120, por lo que algunos fármacos se dirigen contra ella [2].

2.2. Inhibidores de la retrotranscriptasa

Una vez que el virus es capaz de introducir su material genético, dos fragmentos de ARN de cadena simple, en las células, el virus necesita convertir estos ARN en ADN, que es la manera en la que se encuentra el genoma de las células humanas. Para ello, es necesaria una enzima que se encuentra en la cápsida del virus y que entra en la célula junto con el ARN de este, la retrotranscriptasa. Al ser este otro paso fundamental, algunos medicamentos se dirigen contra esta diana, como Combivir y Emtriva. Estos medicamentos pueden ser de dos tipos: nucleosídicos/nucleotídicos y no-nucleosídicos. Los primeros consisten en análogos, es decir, moléculas parecidas pero no idénticas, a los nucleótidos, que son los monómeros por los que está formado el ADN. Cuando la retrotranscriptasa del virus intenta usar estos "nucleótidos falsos", la cadena de ADN no se puede formar correctamente, impidiendo por tanto que el material genético del virus pueda incorporarse a la célula y el virus pueda continuar con su ciclo infectivo. La diferencia entre los nucleosídicos y los

nucleotídicos es que los primeros necesitan un paso previo de activación por fosforilación para convertirse en los segundos. En cuanto a los no-nucleosídicos, estos simplemente se unen a la retrotranscriptasa impidiendo que esta convierta el ARN en ADN y consiguiendo el mismo efecto que los anteriores [2].

2.3. Inhibidores de la integrasa

Una vez el ARN del virus se ha retrotranscrito a ADN, es necesario que este ADN se integre en el ADN del linfocito infectado para poder ejercer su acción. Esta acción es llevada a cabo por una enzima vírica llamada integrasa, que es la diana de medicamentos como el ISENTRES que impiden la acción de esta enzima [2].

2.4. Inhibidores de la proteasa

Finalmente, una vez que el DNA del virus está integrado en la célula, es transcrito a ARN mensajero y este traducido a proteína. Sin embargo, para ser funcionales, estas proteínas víricas necesitan ser cortadas por una proteasa vírica. Algunos medicamentos como Aptivus y Crixivan se encargan de bloquear la acción de esta proteasa, impidiendo la creación de proteínas víricas funcionales. Sin embargo, es recomendable que este tipo de medicamentos se usen en combinación con al menos otros dos fármacos [2].

3. MARAVIROC, UN INHIBIDOR DE LA ENTRADA

Ahora nos vamos a centrar un poco en el fármaco maraviroc (Figura 1), componente del medicamento Selzentry, que es un inhibidor de entrada, siendo un antagonista selectivo CCR5.

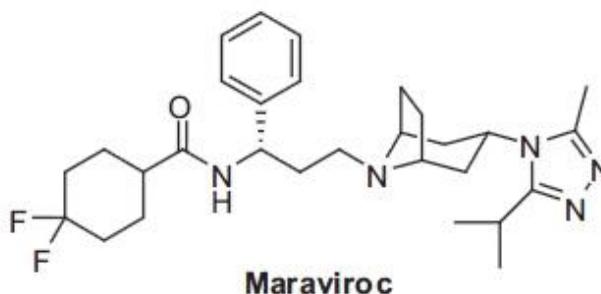


Fig. 1. Estructura química del fármaco maraviroc [3].

El correceptor CCR5 tiene 7 hélices transmembrana representadas en color cian en la Figura 2 y numeradas en la misma con números romanos. Como se puede ver en la Figura, el maraviroc (coloreado en naranja) interacciona con las hélices I, III, V, VI y VII, concretamente con los aminoácidos que se muestran en negrita en la Figura: Triptófano 86 (W86), Ácido Glutámico 283 (E283), Tirocina 108 (Y108), Tirocina 251 (Y251) e Isoleucina (I198) mediante interacciones fuertes [4].

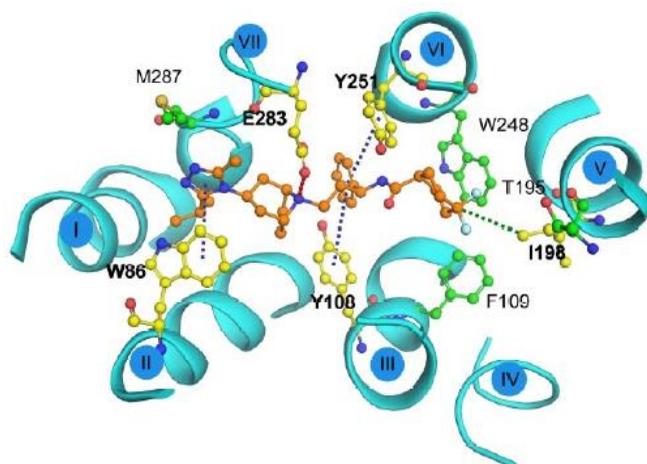


Fig. 2. Interacción del fármaco maraviroc con el receptor CCR5 de los linfocitos Th [4].

Gracias a estas interacciones de maraviroc con el receptor CCR5, este último queda bloqueado y es incapaz de unirse a la proteína gp120 del VIH, impidiéndose, por tanto la fusión de la membrana del virus con la membrana celular y la entrada del virus [3].

4. CONCLUSIONES

Como se ha visto, existen diversas dianas contra las que pueden dirigirse fármacos contra el VIH, consistiendo los tratamientos actuales en distintas combinaciones de estos fármacos para lograr el mejor efecto, a nivel de la disminución o eliminación de los síntomas en los pacientes. El ritmo de descubrimiento de nuevos fármacos ha sido muy elevado en los últimos años y se ha logrado una gran mejora en la calidad de vida de los pacientes de SIDA.

A pesar de todo lo expuesto, todavía existen muchos estudios de desarrollo de nuevos y mejores fármacos contra el SIDA, además de estrategias distintas al uso de medicamentos químicos, como la que se expone en el artículo "Una singular estrategia de evasión contra el SIDA" en el número 4 de esta revista, páginas 118-120. Con todos estos estudios se pretende alargar lo máximo posible y hacer más llevadera y sencilla la vida de las personas afectadas por esta enfermedad, y quizás en un futuro no muy lejano se pueda encontrar una estrategia para erradicarla totalmente.

REFERENCIAS

- [1] R. M. Gulick, MD and MPH, "Antiretroviral Treatment 2010: Progress and Controversies". *J Acquir Immune Defic Syndr.*, no. 55, Suppl 1, pp. 43-48, Dec 2010, doi: 10.1097/QAI.0b013e3181f9c09e.
- [2] Web de AIDSMEDS. www.aidsmeds.com
- [3] K. Qian, S.L. Morris-Natschke and K.H. Lee, "HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy", *Medical Research Reviews*, vol. 29, no. 2, pp. 369-393, Mar 2009, doi: 10.1002/med.20138
- [4] R. Kondru, J. Zhang, C. Ji, T. Mirzadegan, D. Rotstein, S. Sankuratri and M. Dioszegi, "Molecular Interactions of CCR5 with Major Classes of Small-Molecule Anti-HIV CCR5 Antagonists", *Molecular pharmacology*, vol. 73, no. 3, pp. 789-800, Mar 2008, doi: 10.1124/mol.107.042101.



Yolanda Elizabeth González Flores estudia actualmente 5º de Licenciatura en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla. Está muy interesada en el campo de la Microbiología, habiendo trabajado con la beca JAE Intro 2011 en el proyecto "Creación de proteínas de fusión estables para optimizar la transferencia de ADN a células humanas mediante sistemas de secreción tipo IV bacterianos" bajo la dirección de la doctora Matxalen

Llora en el Centro de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, y habiendo participado en las fases Europea y Mundial del concurso internacional de Biología Sintética iGEM 2011 con el proyecto "Flashbacter: Improving Bistability", con el equipo UPO Sevilla. Una vez acabada su Licenciatura, su objetivo es hacer su doctorado en el campo de la Microbiología.