

COLECCIÓN
KUAÁ

LA CULTURA Y EL GENOMA

FEDERICO D. ARIEL
ALBERTO R. KORNBLIHTT
ANDREA V. GAMARNIK
GABRIEL A. RABINICH y ADA G. BLIDNER
RAQUEL L. CHAN



VERA editorial cartonera

LA CULTURA Y EL GENOMA



KUAA es la colección de divulgación de la ciencia de *Vera Cartonera*. Con el vocablo en guaraní que se refiere al saber y al conocer, esta colección propone reunir a los protagonistas del quehacer científico para compartir, en palabras simples, cómo desde el sur empujamos las fronteras del conocimiento.

LA CULTURA Y EL GENOMA

COLECCIÓN
KUAA

FEDERICO D. ARIEL
ALBERTO R. KORNBLIHTT
ANDREA V. GAMARNIK
GABRIEL A. RABINOVICH y ADA G. BLIDNER
RAQUEL L. CHAN



VERA editorial cartonera

COLECCIÓN **KUAA**

dirigida por Federico Ariel

La cultura y el genoma / Federico D. Ariel...
[et al.]; prólogo de Adrián Paenza. —1a ed.—
Santa Fe: Universidad Nacional del Litoral,
2020.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-692-227-2

1. Biología Celular. 2. ADN. 3. Genoma Humano.
I. Ariel, Federico D. II. Paenza, Adrián, prolog.
CDD 576.5

© Ariel, Kornblihtt, Gamarnik, Rabinovich,
Blidner, Chan, 2020.

© del prólogo: Paenza, 2020.

© de la editorial: Vera editorial cartonera, 2020.

Facultad de Humanidades y Ciencias UNL
Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina
Contacto: veracartonera@fhuc.unl.edu.ar



Atribución/Reconocimiento-NoComercial-
CompartirIgual 4.0 Internacional

V

VERA editorial cartonera. Centro de Investigaciones
Teórico–Literarias de la Facultad de Humanidades
y Ciencias de la Universidad Nacional del Litoral.
Instituto de Humanidades y Ciencias Sociales
IHUCSO Litoral (UNL/Conicet). Programa Promoción
de la Lectura Ediciones UNL.



Directora Vera cartonera: Analía Gerbaudo

Asesoramiento editorial: Ivana Tosti

Diseño: Julián Balangero

Este libro fue compuesto con los tipos Alegreya
y Alegreya Sans, de Juan Pablo del Peral
(www.huertatipografica.com).

Se trata de todo lo que nos puede modificar
una cultura pero también está el puto genoma.
De lo que traemos inscripto en la sangre.
Lo demás se me escapa de las manos.

FITO PÁEZ, *Los días de Kirchner*

PRÓLOGO

ADRIÁN PAENZA

El libro que sigue es sencillamente extraordinario, en el sentido *estricto y literal: fuera* de lo *ordinario*. Me explico: ¿cuántas oportunidades tiene uno, usted, yo, de «entrar» en la mente de un científico y navegar junto a ella (o junto a él) en el mar de sus dudas? Compartir investigaciones *en curso*... cuando están aún inconclusas. ¿Cuántas oportunidades tenemos de entender cómo lograron contestarse preguntas que no se habían hecho, descartar hipótesis que habían formulado porque resultaron falsas o inconducentes, desarrollar caminos que no existían y hacer descubrimientos inesperados?

Justamente, lo que separa estos textos de los que estamos acostumbrados a leer, es la *actualidad*, o la posibilidad de compartir *investigaciones en curso*. Esto que usted va a leer está todo puesto «en gerundio»: ¡son cosas que están pasando, hoy y ahora!

Mientras Raquel persevera en su afán por producir cultivos transgénicos, y tropieza no sólo con los escollos científicos sino también los legales, económicos y técnicos, Alberto y su equipo descubrieron en forma inesperada cómo aplicar estudios que venían haciendo desde hace muchísimos años y permitir de esa forma alcanzar una *cura* para una enfermedad que hasta acá, terminaría con bebés *asfixiados* a los pocos meses de haber nacido. ¿Cómo se sentirán ambos (y sus colaboradores) si cada uno de ellos logra el objetivo que se plantean?

Por su lado, Gabriel y Ada se corren de las técnicas tradicionales y abordan el ataque a diferentes tipos de tumores usando respuestas inmunológicas, desconocidas hasta hace muy poco tiempo. Lo recuerdo a Gabriel sentado en un estudio de la televisión pública hace algunos años, tratando apasionadamente de explicarme los estudios sobre las *galectinas* y el futuro que avizoraba. Y la inefable e incansable Andrea persigue junto a su equipo en un laboratorio del Instituto Leloir, cómo salvar vidas combatiendo el dengue, una enfermedad que desaparecería si pudiéramos erradicar la pobreza; pero mientras tanto, como parece que no estamos muy cerca de lograrlo, sus descubrimientos son verdaderamente espectaculares. Si pudiera señalar *un* momento particular, le propongo que no se pierda el segmento dedicado al «secreto *circular* del genoma del virus del dengue»: un verdadero hallazgo que encima contiene una *idea maravillosa*.

Y todo esto, en pocas páginas, como el *extracto* de lo que producen nuestros científicos hoy, en universidades públicas, en establecimientos estatales y como subproducto de la excelencia que generamos como país.

En un momento crítico (¡qué poco que duró la *década* 2005–2015!), en donde en lugar de discutir proyectos y *pensar* el país en el que queremos vivir, hemos caído nuevamente en la batalla de proteger lo construido y evitar, no sólo la *fuga* sino la *estampida de cerebros* de las actuales generaciones de jóvenes, frustrados ante la desatención, «ninguneo» y desprecio del actual gobierno.

Si pudiera (y lo voy a hacer como si efectivamente *podiera*) le recomendaría que no deje de leer el texto que sigue: desde la introducción de Federico Ariel hasta el último *punto* de Raquel, *todo* lo que quedó en el medio... es *imperdible*.

INTRODUCCIÓN

FEDERICO D. ARIEL*

SOBRE GENOMAS, DOGMAS Y PARADOJAS

Desde hace décadas sabemos que la información hereditaria se encuentra codificada en largas cadenas de ácido desoxirribonucleico, más conocido como ADN. Pero, ¿dónde está esa información y cómo podemos decodificarla? Vayamos de lo más grande a lo más pequeño. Todos los seres vivos tenemos distintos órganos, y cada uno de ellos está formado por diferentes tejidos. A su vez, los tejidos están compuestos de células, y éstas, por una gran variedad de moléculas, que incluyen a los ácidos nucleicos, como el ADN y el ARN (el ácido ribonucleico), proteínas, hidratos de carbono (o azúcares) y lípidos (o grasas). Los organismos complejos somos pluricelulares, pero también existen seres unicelulares, más simples. Nuestras células son diferentes entre ellas y están especializadas según el tejido y órgano del que forman parte. Es decir, una célula del hígado estará especializada

*Federico Ariel es Investigador Adjunto del CONICET y docente de la Universidad Nacional del Litoral. Actualmente dirige el Laboratorio de Epigenética y ARNs no codificantes del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL/CONICET). Por su trabajo de tesis doctoral ha recibido el Premio *Jovem Talento* 2011 de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Brasil y el Premio otorgado por el Gobierno de la Provincia de Santa Fe en 2011. Ha sido becario posdoctoral de la European Molecular Biology Organization (EMBO). En 2018 fue galardonado con el Premio Estímulo en Ciencias Biológicas de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

en metabolizar nutrientes, y las células de la retina, en captar la luz que llega al ojo. Sin embargo, en general y salvo algunas excepciones, la información genética es la misma en todas nuestras células, incluidas las del ojo y las del hígado. ¿Cómo resuelven las células con igual material genético, qué camino seguir para diferenciarse y construir organismos complejos?

Para poder responder esta pregunta, necesitamos comprender primero algunas cuestiones. El ADN se encuentra en el núcleo de las células, que funciona como un centro de control, o la oficina del jefe o la jefa. Existe una membrana nuclear, algo así como una pared divisoria entre la oficina (el núcleo) y el resto de la célula, que llamamos «citoplasma». En el citoplasma celular se encuentran todos los trabajadores de la empresa: algunos en espacios abiertos, y otros en oficinas separadas u «organelas» donde, por ejemplo, se genera energía (en las mitocondrias), o se sintetizan, modifican y embalan proteínas (como en el retículo endoplasmático y el aparato de golgi). En las plantas existen organelas especiales para almacenar agua y distintas sustancias (las vacuolas) o captar la energía solar (los cloroplastos). Toda esta organización de la célula está coordinada desde el núcleo celular. Allí, en el ADN, se encuentran inscriptos los genes. Según su definición clásica, un gen es una porción de ADN que codifica una proteína. Cuando decimos que el gen «codifica», nos referimos a que es un mensaje que al ser leído, se sintetizará una proteína. Ésta, a su vez, es una molécula grande, o macromolécula, capaz de cumplir funciones específicas en la célula. El ADN es una doble cadena larga formada por 4 tipos de eslabones, llamados nucleótidos, que cuentan con una estructura común y una parte variable, llamada base nitrogenada. Las 4 bases nitrogenadas son: la Adenina (A), la Citosina (C), la Guanina (G) y la Timina (T). Las dos cadenas se mantienen juntas, apareadas, gracias a la atracción existente entre la C de una cadena y la G de la otra, o entre la A y la T. Cada doble cadena gigante se llama cromosoma, y cada especie de seres vivos tiene un número determinado de genes y de cromosomas.

Cuando decimos que un gen «se expresa», nos referimos a que una porción del ADN se transcribe (se copia) a una molécula de ARN

en el núcleo de la célula. Luego ese ARN lleva el mensaje desde el núcleo hasta el citoplasma (sale de la oficina del jefe, digamos), donde es traducido a la proteína codificada en estructuras llamadas «ribosomas». Una vez que un gen se copia del ADN a ARN, éste sufre una serie de procesamientos y modificaciones hasta que el mensaje esté maduro o listo para ser leído por los ribosomas. Sobre ese procesamiento del ARN primario nos hablará Alberto Kornblihtt en el primer capítulo de este libro. Cuando está listo el mensaje, hablamos de un «ARN mensajero», como no podría ser de otra manera (Figura 1). La transcripción de un gen (ADN) a ARN, y la traducción del mensajero en una proteína es lo que conocemos como el Dogma Central de la Biología.

Las proteínas también son cadenas, o polímeros, pero no de eslabones de nucleótidos sino de aminoácidos. En el ADN, en cada gen, se codifica la información necesaria para determinar qué aminoácidos deben ser utilizados al sintetizar cada proteína. Pero la situación no es tan sencilla, puesto que el ADN tiene cuatro eslabones diferentes (A, C, G y T), y los aminoácidos son más de veinte... Entonces, un nucleótido no podría codificar un aminoácido, porque de ser así el ADN codificaría sólo cuatro aminoácidos diferentes. Si acaso un aminoácido se leyera a partir de la combinación de dos nucleótidos (AT, por

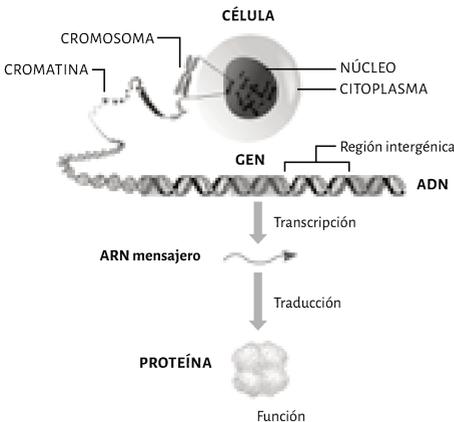


FIGURA 1. En el núcleo de las células se encuentran los cromosomas que están hechos de ADN asociado a proteínas, formando la cromatina. La figura muestra un solo cromosoma y la descompactación de su ADN. Los genes son segmentos del ADN de los cromosomas, que tienen la capacidad de ser copiados para formar moléculas de ácido ribonucleico (ARN) mediante el proceso de transcripción. El ARN llamado mensajero sale del núcleo y se dirige al citoplasma, donde ocurre su traducción en los ribosomas, es decir, el proceso de fabricación de la proteína codificada por el gen. Nótese que los genes no se encuentran juxtaponidos, sino separados por regiones intergénicas del ADN.

ejemplo, o TG), tampoco alcanzaría para codificar toda la variedad de aminoácidos existentes, ya que las combinaciones posibles serían $16 (4 \times 4)$. Esta situación nos ayuda a entender por qué el «código genético» se lee cada 3 nucleótidos, lo que llamamos un «codón». Cada codón determina que se incluya un aminoácido en particular. Por ejemplo, siempre que en el ADN de un gen se lea «ATG», se incluirá un aminoácido llamado Metionina en la proteína sintetizada en los ribosomas.

Y a todo esto, si el ADN contiene la información genética, ¿para qué sirven las proteínas? Estas moléculas son las encargadas de dar estructura y de realizar tareas en la célula. Las proteínas estructurales son aquellas que levantan el edificio, la célula. Las funcionales, por su parte, transmiten señales y llevan a cabo trabajos específicos y necesarios del tipo celular en cuestión. Las enzimas, por ejemplo, son proteínas que transforman una molécula en otra, y se encargan de sintetizar o degradar ARN, azúcares, lípidos, otras proteínas y de combinar todas estas moléculas de manera que una célula cumpla las funciones que le corresponde. Al conjunto de las reacciones enzimáticas es a lo que llamamos comúnmente «metabolismo celular».

Es decir que la identidad de una célula, que es diferente si forma parte del hígado o del ojo humano, está determinada por la presencia de un grupo específico de proteínas estructurales y funcionales. En otras palabras, en un tipo celular específico del ojo se expresan genes muy diferentes a los de una célula de un tejido hepático. Por este motivo, la regulación de la expresión de los genes es sumamente fina y está extremadamente controlada, y abarca puntos de control sucesivos, que van desde la organización del ADN en el núcleo, hasta la estabilidad y degradación de las proteínas. De esta manera, cada célula de nuestro cuerpo cumplirá un rol específico y coordinado con el resto de sus células vecinas, formando tejidos, que a su vez conforman los órganos, asociados en sistemas (como el respiratorio, el circulatorio, y otros) de un organismo.

Mucho tiempo antes de poder comenzar a leer las primeras secuencias de ADN de los seres vivos, ya se había advertido que los organismos superiores más complejos no tenían necesariamente más

ADN en sus células. A esta incógnita evolutiva se la conoció como «la paradoja del valor C », siendo C el valor del contenido de ADN. Por ejemplo, los seres humanos tenemos menos ADN en nuestras células que la uva o un cocodrilo. Un dato difícilmente digerible por nuestro ego, ni con una vida entera de psicoanálisis. Más recientemente, con el advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos, pudimos por fin leer el ADN. Pero la situación no mejoró: nos encontramos con que el número de genes tampoco era significativamente superior en humanos que en especies que podríamos considerar más simples. Sin embargo, los avances de la biología molecular nos han permitido analizar el panorama con más herramientas. El genoma, es decir el conjunto de genes y su disposición en el núcleo celular, muestra diferentes grados de complejidad según los organismos. Por ejemplo, en las últimas décadas hemos descubierto que la mayor parte del genoma de los organismos superiores no contiene ningún gen, porción que se conoce con el nombre de «genoma no codificante» (porque no codifica proteínas). Durante mucho tiempo se pensó que el genoma no codificante, particularmente grande en organismos complejos, era un reservorio de ADN que podría sufrir mutaciones potencialmente útiles a la evolución de las especies, y se lo llamó «ADN basura». Sin embargo, en los últimos años hemos descubierto que a pesar de no codificar proteínas, gran parte del genoma no codificante se transcribe de todos modos a ARN, que si bien no son portadores de ningún mensaje, resultaron participar en la regulación fina de la expresión de los genes que codifican proteínas. Entre todas las funciones de los llamados «ARNs no codificantes», se encuentra la de modular la manera en que el ADN se empaqueta y ordena adentro del núcleo celular, una característica que estudia el campo de la epigenética (*epi* en latín significa sobre), es decir, lo que se encuentra por sobre la genética. La epigenética no estudia la información genética en sí misma, sino la manera en que ésta se organiza en el espacio. Nuestro ADN no se encuentra desnudo, sino que está asociado a proteínas y ARN de una manera muy minuciosa, en lo que se conoce como «cromatina», para ocupar más o menos compactadamente el volumen del núcleo.

Para dimensionar la importancia de la organización de la información genética en el espacio nuclear, el investigador norteamericano Bruce Alberts propuso en su clásico libro «Biología molecular de la célula», una analogía brillante: si el microscópico núcleo de una célula humana tuviera acaso el tamaño de una pelota de tenis, entonces el ADN sería un delgado hilo de 40 km de largo enrollado dentro de esa pelota. ¿Se imaginan un hilo que una las ciudades de Córdoba y Carlos Paz enrollado en una pelota de tenis? Evidentemente, el ADN de cada una de nuestras células debe estar cuidadosamente empaquetado para que se expresen correctamente los genes indicados en el momento y la intensidad justa, para dar a cada célula la identidad que necesita.

LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES: GENOMA VERSUS CULTURA

En la era de la biología molecular que atravesamos en la actualidad, ya no podemos focalizarnos en tal o cual gen para estudiar un organismo, sino que necesitamos realizar nuestras investigaciones e interpretaciones de una manera integrada, en la que la regulación de la expresión génica está interconectada y responde de manera dinámica y coordinada a señales internas del organismo y a su vez del ambiente. Hoy en día, entendemos que la complejidad de un organismo está determinada por la variedad de combinaciones en que un mismo genoma pueda expresar sus genes en proteínas, dando lugar a un número mayor de células diferentes que puedan cumplir roles específicos en un organismo. En la regulación diferencial de la expresión de los genes entre una célula y otra participan múltiples mecanismos moleculares, incluido el control del genoma no codificante, antes considerado basura. A su vez, la capacidad codificante de un genoma se incrementa notablemente en los organismos superiores al poder, a partir de un mismo gen, procesar los ARNs primarios de maneras alternativas y dar lugar a diferentes ARNs mensajeros, y por ende, distintas proteínas. En pocas palabras: un gen, muchos mensajes. El tema del procesamiento alternativo del ARN será abordado en el primer capítulo del libro.

Como dijimos, la regulación de la expresión génica está determinada por un sinnúmero de señales internas del organismo, pero también por el entorno, por el ambiente. No somos otra cosa que la síntesis dinámica de la interacción entre nuestra información genética y las señales del ambiente. Eso que Fito definió tan poética e intuitivamente como la cultura y el genoma. Nuestra alimentación, el estrés que sufrimos, la interacción con microorganismos benéficos o patógenos, y todo lo que tenga que ver con nuestra vida cotidiana, afecta más o menos directamente la expresión de nuestros genes.

En *La cultura y el genoma*, reunimos a algunos de los más destacados biólogos de nuestra historia científica, para explorar juntos el tema de los genes y su regulación como resultado de las señales internas del organismo y la presión ejercida por nuestro entorno. Y además, los conceptos abordados estarán vinculados a descubrimientos y desarrollos realizados en los laboratorios argentinos. Alberto Kornblihtt nos explicará paso a paso cómo se procesa el mensaje llevado por un ARN del núcleo al citoplasma, y de qué manera eso contribuye a diversificar la población de proteínas sintetizadas en una célula. Además, Alberto nos contará cómo los conocimientos alcanzados por la ciencia básica, fueron aplicados para el tratamiento de niños que sufren una enfermedad genética llamada atrofia muscular espinal. Luego, Andrea Gamarnik nos explicará cuáles son las características del genoma del virus del dengue, y cómo se desarrolla la batalla entre nuestras células y el virus durante la infección. En el tercer capítulo de este libro, Gabriel Rabinovich y Ada Blidner nos guiarán en un recorrido histórico a través de nuestro aprendizaje acerca de cómo la desregulación de la expresión de algunos genes puede derivar en la transformación de las células en versiones rebeldes y dar lugar al desarrollo de tumores. Además, Gabriel y Ada nos contarán acerca de los descubrimientos de su grupo de investigación, aplicados en nuevas terapias contra el cáncer y enfermedades autoinmunes. Por último, Raquel Chan nos ayudará a comprender cómo a través de miles de años de agricultura, hemos ido seleccionando ciertas variantes de genes en función de las cualidades útiles de las plantas para los seres humanos. En las últimas décadas hemos

descubierto que la selección de ciertos genes, llamados factores de transcripción, fue clave en la domesticación de los cultivos, y hoy tenemos la capacidad científica y tecnológica de seleccionar esos genes específicos y expresarlos con fines particulares.

A través de cuatro capítulos fascinantes, no sólo aprenderemos un poco más acerca de los genes y su expresión regulada por señales internas y externas, sino que también tomaremos conciencia de los avances científicos desarrollados en laboratorios públicos nacionales y del capital humano con el que contamos en nuestro país. Tal vez terminemos de dar vuelta la última página sintiéndonos un poco más orgullosos de nuestra ciencia, así como más convencidos de la importancia que tiene apostar a la investigación básica, y a la aplicación de los conocimientos en desarrollos que mejoren la calidad de vida de nuestros pueblos.

SPLICING ALTERNATIVO: EL SASTRE DE NUESTRAS CÉLULAS

ALBERTO R. KORNBLIHTT*

GENES, GENOMAS Y MENSAJES

Los genes son segmentos de ADN capaces de ser transcritos —es decir, copiados— a una molécula de ARN (ácido ribonucleico) con igual secuencia de bases que el gen. Los genes no se encuentran yuxtapuestos a lo largo de los cromosomas, sino más bien esparcidos y separados a grandes distancias por secuencias de ADN intergénicas. Por consiguiente, todo el ADN humano está constituido por genes y por estas secuencias. Llamamos «genoma» al conjunto de todos los genes y regiones intergénicas de una célula de una especie.

En los humanos las regiones intergénicas constituyen el 70% del genoma, mientras que los genes representan sólo un 30%. Se estima que el genoma humano tiene unos 20.000 genes. Estos genes

*Alberto Konrblhttt es Investigador Superior del CONICET y Profesor Titular Plenario de la Universidad de Buenos Aires. Actualmente es Director del Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (UBA/CONICET) y en 2018 fue elegido por sus pares para integrar el Directorio del CONICET. Su laboratorio investiga la regulación del splicing alternativo del ARN mensajero, explicando cómo un único gen es capaz de generar muchas proteínas. Durante su carrera, ha sido galardonado con la beca Guggenheim (1991) y los premios Investigador de la Nación Argentina (2010), Konex de Brillante como el mejor investigador del país de la década 2003–2013, TWAS en Ciencias Médicas (2012) otorgado por la Academia de Ciencias para el Mundo en Desarrollo. Es miembro de academias nacionales de ciencias de Argentina y Latinoamérica, de la European Molecular Biology Organization (EMBO) y de la National Academy of Sciences de EEUU.

codifican distintos tipos de ARN, entre los que se encuentran los llamados ARNs mensajeros, que codifican a su vez proteínas (Figura 1 de la Introducción). Los otros ARNs, los que no son mensajeros, reciben el nombre genérico de ARNs no codificantes: no son intermediarios entre el gen y la proteína sino que cumplen funciones en sí mismos.

EXONES, INTRONES, *SPLICING* Y *SPLICING* ALTERNATIVO

Cada uno de los genes que codifican proteínas tiene regiones que estarán representadas en el ARN mensajero maduro intercaladas por otras cuyas secuencias no estarán representadas allí. Las primeras regiones se llaman «exones», en tanto que las segundas son los «intrones». La enzima que transcribe el gen, llamada ARN polimerasa, fabrica un ARN precursor, llamado «transcripto primario» o «pre-ARN mensajero», que lleva información tanto de los exones como de los intrones. Dentro del núcleo, y de manera simultánea a la transcripción del gen, un complejo molecular formado por proteínas y ARN llamado «spliceosoma», elimina los intrones y une los exones entre sí, en el mismo orden correlativo en que se encontraban en el gen. Finalmente, el ARN mensajero maduro sin intrones abandona el núcleo y es traducido por los ribosomas del citoplasma celular, que fabrican la proteína correspondiente.

Pero la cosa es aún más compleja... Un mismo gen puede dar muchas variantes de proteína. El mecanismo se conoce como *splicing* alternativo, y consiste en que durante el *splicing* algún exón, por ejemplo, pueda ser alternativamente incluido en o excluido del ARN mensajero maduro. Algo así como si el ARN mensajero maduro fuera un tren formado por numerosos vagones (los exones) enganchados entre sí y existieran dos formaciones distintas del tren, una con el vagón comedor colocado en el medio y otra sin él. Diríamos que el tren tiene dos formaciones posibles, pues en el caso de los genes decimos que el gen puede originar dos ARN mensajeros distintos y, por lo tanto, dos proteínas distintas (Figura 2).

El *splicing* alternativo ha sido detectado en aproximadamente el 95% de los genes humanos. Algunos genes presentan dos variantes de ARN mensajero y, por ende, de proteínas. Sin embargo, hay muchos casos

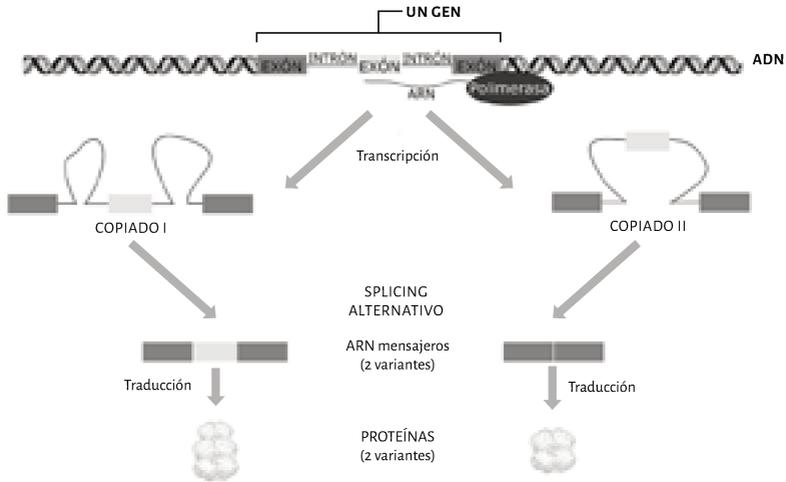


FIGURA 2. El *splicing* alternativo permite que cada gen codifique más de una proteína. Cada gen está subdividido en regiones de ADN diferenciadas llamadas exones e intrones. Al ocurrir la transcripción se fabrica un ARN precursor, que tiene la información de ambos (exones e intrones). Mientras el ARN precursor se encuentra en el núcleo, los intrones son eliminados y los exones son ligados entre sí mediante el proceso conocido como *splicing*. Cuando un mismo tipo de precursor puede sufrir dos o más modos de *splicing* (en el caso de la figura, dos) estamos en presencia del *splicing* alternativo.

donde el número de variantes por gen es muy alto: llega a decenas o centenares. Esto indica que aun cuando conociéramos la secuencia de cada uno de los miles de genes humanos, no sabríamos con exactitud cuántas proteínas distintas son capaces de producir. Se estima que podría haber centenares de miles de proteínas distintas codificadas por el genoma humano. En efecto, en los humanos y en general en los vertebrados, el número de proteínas es mucho mayor que el número de genes, lo cual permite un nivel de complejidad mucho mayor que en los invertebrados, donde el número de genes no es muy diferente pero, como el *splicing* alternativo es menos frecuente, el número de variantes proteicas es menor. Dicho de otro modo, no somos más complejos que un gusano porque tengamos más genes sino porque con el mismo número de genes podemos hacer muchas más proteínas diferentes.

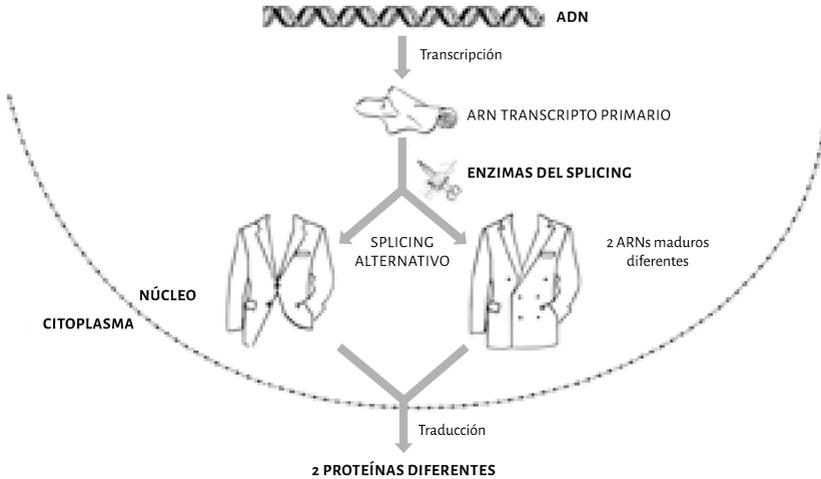


FIGURA 3. A partir de un mismo tipo de corte de tela (transcripto primario), el sastre (enzimas del *splicing*) puede hacer dos tipos de saco (ARN mensajeros maduros), uno derecho y el otro cruzado.

En algunos genes que producen dos variantes de proteínas por *splicing* alternativo, cada una de ellas tiene una función particular en el organismo. Metafóricamente, es como si el gen (ADN) fuera una fábrica de muchas piezas de cortes de tela largas (ARN transcripto primario), todas iguales. Las enzimas que llevan a cabo el *splicing* son como tijeras, agujas e hilo, de modo tal que del mismo tipo de corte de tela pueden producir dos sacos distintos, uno derecho y un cruzado, por ejemplo, según dónde corten y dónde cosan (Figura 3). En otros tipos de genes que producen dos variantes, sólo una de ellas es funcional, en tanto que la otra no da lugar a la proteína correcta.

LA CURA DE UNA ENFERMEDAD GRAVE HUMANA A TRAVÉS DEL CONTROL DEL *SPLICING* ALTERNATIVO

La atrofia muscular espinal (AME) es una grave enfermedad hereditaria que afecta a algunos niños desde el nacimiento. Los padres de estos niños no están enfermos, pero, por poseer copias alteradas

(mutadas) de un gen llamado SMN1, decimos que son portadores, es decir, que son capaces de transmitir a través de sus espermatozoides y óvulos, el gen enfermo a sus hijos. Los bebés que heredaron sus dos copias mutadas del gen SMN1 no producen suficiente cantidad de la proteína SMN, necesaria para que sus células nerviosas (neuronas) inerven adecuadamente a sus músculos y den la orden para que se contraigan. De esta manera van perdiendo la capacidad de contraer sus músculos, tanto los de sus extremidades como los de su caja torácica que son necesarios para que puedan respirar. Sin atención médica estos bebés morirían asfixiados a los pocos meses de haber nacido. Hasta el año 2016, la única forma de sobrevivir era mediante aparatos que insuflen mecánicamente aire en sus pulmones. Aun así, sin movilidad muscular, quedaban postrados de por vida.

En diciembre de 2016, se aprobó un tratamiento que tiene un impresionante poder curativo de la AME. El investigador que encontró la cura es el biólogo molecular uruguayo Adrián Krainer, que trabaja desde hace más de 30 años en los EEUU. Adrián se pasó toda la vida estudiando los mecanismos moleculares que controlan el *splicing* alternativo en el interior de las células. Sorprendentemente, Adrián no pensó en «curar» al gen mutado SMN1 sino en aprovechar que en los humanos existe un gen adicional, llamado SMN2 que podría funcionar como respaldo, o *backup* de SMN1, porque su producto también es la proteína SMN. El problema es que SMN2 pertenece a ese tipo de genes que produce dos variantes de *splicing* alternativo donde sólo una de ellas es funcional. Debido a la secuencia de bases del gen SMN2, predomina la variante no funcional que carece del exón alternativo número 7 (como en la variante de la derecha en la Figura 2) y es por ello que SMN2 no produce suficiente cantidad de proteína SMN para que las neuronas que inervan los músculos funcionen correctamente. Con este conocimiento, a Adrián se le ocurrió introducir en las neuronas enfermas un trocito corto de ADN (hoy conocido con el nombre comercial de Spinraza) que se dirija específicamente hacia el gen SMN2 y le cambie su *splicing* alternativo de modo de promover la inclusión del exón 7 en el ARN mensajero maduro. Lo que logró, primero en células cultivadas en el laboratorio, luego en ratones de

experimentación y finalmente en pacientes con AME, fue «despertar» al gen SMN2 para que produzca cantidades suficientes de la proteína SMN, cosa que el gen SMN1 no puede hacer por estar mutado. El éxito fue contundente. Los niños en que se había detectado la enfermedad por diagnóstico genético, fueron tratados a pocas semanas de nacer y no sólo no perdieron movilidad sino que, con el correr de los años, desarrollaron normalmente sus músculos de modo de no necesitar asistencia mecánica para respirar, cobrar fuerza en sus extremidades, mantenerse parados, caminar y andar en triciclo.

Adrián se convirtió en una celebridad porque fue el primer científico en curar una enfermedad neurodegenerativa. El reconocimiento no sólo vino del mundo académico sino también, y muy especialmente, de los padres y familiares de los chicos enfermos.

Nuestro laboratorio en Buenos Aires también se ha dedicado a estudiar el control del *splicing* alternativo desde hace más de 25 años. Nunca habíamos encarado la cura de una enfermedad hasta que hace 4 años, impulsados por los familiares de pacientes argentinos con AME, nucleados en FAME (Familias Atrofia Muscular Espinal de Argentina), comenzamos un proyecto de investigación que se plantea utilizar los conocimientos descubiertos en nuestro grupo para generar una terapia combinada que sume nuestras herramientas al ya consagrado tratamiento con Spinraza. Establecimos una colaboración científica con Adrián, obtuvimos financiamiento no sólo de FAME sino también de CuresMA, la fundación de familiares de pacientes con AME de EEUU, dos discípulos ganaron becas doctorales del CONICET para llevar a cabo los experimentos, y al día de hoy podemos decir que los resultados obtenidos, por ahora en células cultivadas y en ratones, son muy prometedores. Debido a los alcances de este capítulo, es muy difícil entrar en detalles sobre nuestro aporte. A grandes rasgos, comprobamos que si tratamos a las células con una droga que hace que la enzima que transcribe a los genes —la ya mencionada ARN polimerasa que se encarga de copiarlos para formar el ARN transcrito primario— corra más rápido que lo normal, el efecto de Spinraza en lograr que se fabriquen cantidades adecuadas de la proteína SMN es mucho mayor. Por suerte, algunas de estas drogas

que aumentan la velocidad de la ARN polimerasa ya están aprobadas como medicamentos para tratar otras enfermedades con lo cual, si nuestros experimentos tienen éxito, la terapia combinada podrá ser aplicada en un plazo relativamente corto.

El trabajo de Adrián, y en menor medida el nuestro, son los mejores ejemplos de la importancia de la investigación básica para beneficio de la sociedad. Es imposible obtener resultados transferibles a la medicina, la agricultura o la industria sin una fuerte y bien financiada investigación básica. Es imprescindible conocer al detalle los mecanismos de funcionamiento de las células y sus genes para poder encarar nuevas terapias. Muchas veces se dice que la investigación básica sólo está motivada por la curiosidad del investigador y que países como el nuestro, con altos niveles de pobreza, no pueden darse el lujo de financiar investigación básica. Ambas afirmaciones son falsas. La curiosidad del investigador es un ingrediente, pero no el principal. Hay preguntas fundamentales en cada disciplina que aún no han sido respondidas a nivel mundial y nuestros investigadores tienen la capacidad, el estudio y la preparación adecuados para abordarlas. Sólo apoyándose en esas capacidades, en gran medida consecuencia del excelente nivel de nuestras universidades nacionales estatales, es posible llevar a cabo investigaciones fundamentales de las que surjan aplicaciones y transferencia. No hay atajos. Si no se sabe cómo funciona el *splicing*, no se puede curar una enfermedad tan devastadora como la AME.

DESARMANDO AL VIRUS DEL DENGUE

MECANISMOS DE REPLICACIÓN DEL VIRUS Y ESTRATEGIAS DE DEFENSA DE LA CÉLULA

ANDREA V. GAMARNIK*

EL DENGUE, UN ENEMIGO COMÚN

El virus del dengue causa en humanos la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante a nivel mundial. Esto es debido a la gran cantidad de infecciones que ocurren en distintas partes del mundo, a la falta de antivirales o vacunas efectivas para su control y a la carga económica que representa para los sistemas de salud pública de los países afectados. El dengue está estrechamente relacionado con la pobreza. Las regiones del continente americano con urbanización descontrolada, sistemas inadecuados de viviendas y falta de suministro de agua potable son las de mayor densidad demográfica del *Aedes aegypti*, mosquito responsable de la transmisión del dengue,

* Andrea Gamarnik es Investigadora Principal del CONICET y Jefa del Laboratorio de Virología Molecular de la Fundación Instituto Leloir (FIL). Actualmente es Directora del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires del CONICET. Su trabajo de investigación está abocado al estudio de los mecanismos moleculares de la replicación de los virus del Dengue y Zika. Durante su carrera ha recibido numerosas distinciones, entre ellas ha sido galardonada con el Premio Internacional L'Oreal UNESCO Por las Mujeres en la Ciencia en representación de América Latina, forma parte de la Academia Americana de Microbiología y ha sido parte del programa internacional del Instituto Médico Howard Hughes de los Estados Unidos. Asimismo ha recibido el premio Konex en Ciencia y Tecnología mención en Microbiología, el premio trayectoria de la Asociación Argentina de Microbiología 2017, el premio Democracia 2017 y ha sido nombrada Personalidad destacada de la Ciencia de la Ciudad de Buenos Aires.

y en consecuencia son las regiones con las mayores epidemias de dengue.

Las infecciones por dengue pueden no tener síntomas y pasar desapercibidas. Eso ocurre en dos de cada tres personas infectadas. El resto de las infecciones están asociadas a síntomas leves o graves. Los cuadros leves se manifiestan con fiebre, dolor muscular, dolor de articulaciones, sarpullido, mientras que los casos graves se acompañan de hemorragias internas que pueden causar la muerte. Existen cuatro virus del dengue diferentes, conocidos como «serotipos». Se denominan serotipos 1, 2, 3 y 4. Si bien los cuatro virus son muy parecidos en relación a los cuadros clínicos y todos pueden causar síntomas leves o graves, el sistema inmune de la persona infectada los diferencia y no existe protección cruzada. Esto quiere decir que la infección con un serotipo resultará en que la persona permanezca protegida de por vida contra ese virus en particular, o sea que no se volverá a infectar con ese mismo en toda su vida ya que tendrá anticuerpos que lo reconozcan, como si estuviera vacunada. Pero no estará protegida para los otros tres virus, quedando vulnerable a nuevas infecciones por dengue. En relación a esto, existe un fenómeno característico del dengue en el que una persona que ha sido infectada y ha quedado protegida para un serotipo del virus del dengue no sólo no está protegida para los otros tres serotipos sino que, si se infecta con uno de ellos, tiene mayor riesgo de manifestar cuadros clínicos graves. Esto se debe a que los anticuerpos producidos en la primera infección, facilitan la entrada del virus en la segunda infección. Este fenómeno, muy complejo, conocido con el nombre de ADE (del inglés *antibody dependent enhancement*, es decir amplificación dependiente de anticuerpos), es la gran limitación en el desarrollo de vacunas para el dengue. Se debe obtener una que sirva para cuatro virus al mismo tiempo, de tal forma de garantizar la protección contra todos a la vez. Actualmente en América se encuentran presentes los cuatro tipos del dengue, habiendo regiones endémicas donde co-existen varios serotipos en el mismo lugar, poniendo en riesgo a la población de infectarse con serotipos diferentes y en consecuencia a estar expuestos a cuadros graves de la enfermedad.

El gran desafío de obtener cuatro vacunas en una ha retrasado el desarrollo de inoculaciones efectivas para el dengue. En la actualidad existe una vacuna tetravalente, es decir, para los cuatro virus a la vez, que ha sido recientemente aprobada sólo en algunos países. Esta vacuna, desarrollada por Sanofi Pasteur, tiene limitada aplicación debido a la desigual protección para los distintos tipos del virus. Por este motivo la comunidad científica tiene aún una enorme tarea y se debe continuar con investigaciones que permitan entender a nivel molecular cómo funcionan los cuatro serotipos del virus del dengue y así poder desarrollar nuevas vacunas que protejan contra todos. Además, esa vacuna debe ser económica, efectiva y factible de distribuir en las regiones geográficas que más la necesitan. Tremendo desafío.

GENOMA Y MENSAJERO EN UNA MISMA MOLÉCULA

A diferencia de los organismos vivos que conservan su material genético en el ADN, el virus del dengue, como ocurre con muchos virus, lo almacena en una molécula de ARN llamada genoma viral. El genoma del dengue es diminuto si lo comparamos con aquél de animales y plantas, y consiste en una única molécula de once mil nucleótidos que contiene toda la información genética para que el virus pueda multiplicarse cuando infecta a una célula. Pero el genoma viral no sólo tiene la información genética sino que además funciona como ARN mensajero para la producción de las proteínas virales. O sea que si lo comparamos con la célula, el virus del dengue se saltea el paso de la transcripción, no necesita pasar de ADN a ARN para la síntesis de proteínas, ya que su genoma en sí mismo es un ARN. Además, a diferencia de los ARN mensajeros celulares, el ARN del dengue codifica en una sola molécula, para las diez proteínas del virus.

Si volvemos para atrás un casillero y nos preguntamos qué es el virus del dengue, podemos decir que es una partícula microscópica inerte, compuesta por el genoma viral, que ya sabemos qué es, protegido por una cubierta proteica. Dicha cubierta se llama cápside, que a su vez está envuelta con una membrana lipídica recubierta con dos proteínas del virus, llamadas envoltura y membrana. Eso es todo. La

partícula viral tiene tres proteínas: la cápside, la envoltura y la membrana, que en conjunto protegen al material genético. La partícula del virus por sí sola no hace nada. Pero tiene la capacidad de entrar e infectar a células humanas y de mosquito. Así el virus tiene acceso a la maquinaria de la célula y a la energía necesaria para multiplicar sus propios componentes. Un virus que entra a una célula lleva las directrices para producir miles de virus nuevos. Pero para esto debe usurpar a los ribosomas de la célula y sintetizar sus propias proteínas. Además, debe utilizar la materia prima saqueada de la célula para hacer copias de su ARN. La proteína encargada de producir estas copias se encuentra codificada en el material genético del virus y se denomina polimerasa NS5. Esta polimerasa se pega a moléculas de ARN y con gasto de energía produce, muy eficientemente, múltiples copias de ese ARN. De esta manera, el virus genera más genomas para ensamblar nuevas partículas virales.

Cuando comenzamos a estudiar en nuestro laboratorio la biología molecular del virus del dengue, nos dimos cuenta de que había un problema fundamental en el proceso de la multiplicación del genoma del virus. El problema era el siguiente: la polimerasa del virus debía copiar al genoma viral, pero éste se encontraba en el citoplasma de la célula rodeado de millones de moléculas de ARN que pertenecían a la célula. La polimerasa debía encontrar a una molécula de ARN en particular (la del virus) en un millón. O sea era como encontrar a una aguja en un pajar. ¿Cómo ocurría este reconocimiento? ¿Cómo hacía la polimerasa para diferenciar entre los ARN de la célula y el ARN del virus? ... Allá vamos.

EL SECRETO CIRCULAR DEL GENOMA DEL VIRUS DEL DENGUE

En nuestro laboratorio comenzamos a estudiar el tema de la polimerasa viral y la multiplicación del material genético del virus hace unos 15 años. Para esto debimos construir virus genéticamente modificados en el laboratorio a los que le fuimos sacando pedazos del genoma e íbamos estudiando si la polimerasa podía o no copiarlo. Así logramos identificar señales en el ARN que sólo se encontraban en

el genoma del virus del dengue. Esto permitía que la polimerasa se pegara específicamente a esa molécula y no se pegara a otras. Estas señales, codificadas en ciertos plegamientos del ARN, atraían a la polimerasa al extremo inicial del ARN viral y permitían así su copiado específico. Con esto respondimos la primera pregunta, pero nos encontramos con otro problema que despertó nuestra curiosidad.

Las polimerasas tienen la propiedad de copiar el ARN desde un extremo al otro, con una direccionalidad. Si bien ésta es una convención, podemos decir que copia desde el fin hacia el principio de la molécula, moviéndose sobre la misma de atrás hacia adelante. O sea que comienza desde el fin. Pero nosotros habíamos descubierto que la señal de pegado de la polimerasa estaba al principio de la molécula. Así surgió la pregunta que nos devanó los sesos por algunos años ¿Cómo hace entonces la polimerasa, que está pegada al principio de la molécula, para saltar once mil nucleótidos del genoma y comenzar el copiado en el otro extremo? Este problema, que no fue nada sencillo, lo resolvimos formando un equipo de trabajo con virólogos, bioquímicos y biofísicos de distintos laboratorios de nuestro país. Así descubrimos que el genoma del virus del dengue adquiere en el espacio una forma circular. Empleando un microscopio especial, que se llama microscopio de fuerza atómica, pudimos obtener imágenes de moléculas individuales de ARN y vimos por primera vez que el genoma del virus del dengue formaba círculos. Nuestros resultados demostraron que la polimerasa unida a la señal de reconocimiento del principio de la molécula estaba tocándose con el extremo donde debía comenzar el copiado. Estos estudios que, como ya dije, llevaron muchos años de trabajo, develaron el misterio circular del genoma del virus del dengue y permitieron entender cómo hace el virus para producir miles de moléculas de ARN viral en una célula infectada.

Claro que ustedes pueden preguntarse: ¿Tantos años de trabajo para entender el mecanismo de multiplicación del dengue? ¿En qué ayuda esta información para combatir al virus? Es cierto, cuando empezamos estas investigaciones no estábamos precisamente buscando la forma de controlar al virus. Sin embargo no es difícil darse cuenta que cuanto más sepamos del enemigo, más fácil será encontrar sus

puntos débiles. Y así fue. Al encontrar que la polimerasa debe reconocer una señal en el ARN y esto es sí o sí necesario para que haya infección, encontramos un talón de Aquiles en el virus que podremos usar para controlarlo, o sea para diseñar antivirales.

LA BATALLA ENTRE EL VIRUS Y LA CÉLULA

Cuando un virus infecta a una célula altera sus funciones vitales y puede, en ciertos casos, causarle la muerte. Una vez adentro de la célula hospedadora, el virus toma el control y entre otras cosas remodela la arquitectura de las membranas celulares para edificar estructuras que funcionarán como fábricas de los componentes virales. Estas fábricas, en el caso particular del dengue, están formadas por paquetes de vesículas. Este es justamente el lugar donde la polimerasa hará las copias del genoma viral. El descalabro que causa el virus en la célula desencadena una rápida respuesta por parte de ésta para detener o limitar la replicación viral. A esto se lo llama «respuesta antiviral innata», que representa la primera barrera que pone la célula para defenderse de la infección. Debido a que el dengue infecta mosquitos y humanos, el virus se debe enfrentar a la respuesta antiviral innata de estas dos especies, que son por cierto muy diferentes. Veamos de qué se trata cada una de ellas.

Las células humanas responden a la infección viral principalmente por acción de proteínas llamadas «interferones». El interferón de tipo I se activa por medio de sensores celulares que patrullan el citoplasma buscando componentes virales. Estos sensores reconocen particularmente estructuras en el ARN que son intermediarios del copiado del genoma viral. Cuando se activan, gatillan la expresión de numerosos genes celulares, y así crean un estado antiviral que tiene como fin frenar a la infección. Esta tarea es muy difícil, ya que el virus hace uso de la maquinaria de la célula, por ende para frenarlo, la célula corre el riesgo de afectar también algunas de sus propias funciones. En ciertos casos cuando ese freno se prolonga en el tiempo la célula puede decidir su propia muerte. A este proceso se lo llama «apoptosis». De esta forma la célula agredida se sacrifica por las demás,

impidiendo que el virus se propague a otras células. Sin embargo, el mayor problema para una célula que se enfrenta a un virus con genoma de ARN, como el dengue, es su gran capacidad evolutiva. Como los virus convivieron siempre con células, han evolucionado mecanismos altamente sofisticados para desactivar las funciones antivirales del interferón. O sea que ante un ataque del virus a la célula, existe una primera respuesta de defensa innata de la célula, y finalmente el virus contraataca con mecanismos de desactivación que evaden a esa respuesta innata (figura 4). Una verdadera batalla.

Entre los mecanismos que tiene el virus del dengue para evadir la respuesta antiviral de la célula, la polimerasa viral NS5 tiene una función central, porque es capaz de unirse y llevar a la destrucción a una proteína celular llamada STAT2. Esta proteína celular es una de las responsables de activar la expresión de los genes antivirales dictada por el interferón de tipo I. De esta forma el virus bloquea y desactiva a la respuesta antiviral. Debido a que en nuestro laboratorio estábamos estudiando las funciones de la polimerasa del virus del dengue, cuando se descubrió hace unos años que esta proteína viral era también un eslabón central en la evasión de la respuesta antiviral, decidimos estudiar los mecanismos moleculares en los que participaba la polimerasa del dengue en este nuevo proceso.

La primera sorpresa fue que la proteína NS5 era capaz de ingresar al núcleo de las células infectadas, lo que fue desconcertante ya que su principal función se desarrollaba en el citoplasma. Para estudiar las funciones que tenía NS5 buscamos a qué proteínas de la célula se pegaba. Con este fin incorporamos un anzuelo molecular a la proteína NS5 que no afectaba sus funciones. Infectamos un cultivo de células humanas con un virus de dengue que codificaba en su ARN a una proteína NS5 modificada y, cuando el virus logró una infección eficiente, pescamos a la proteína NS5 por medio del anzuelo incorporado y obtuvimos a todas las proteínas celulares que estaban pegadas a ésta. Así identificamos decenas de proteínas de la célula, entre las que por supuesto se encontraba STAT2, lo que nos indicó que el experimento había funcionado. Así descubrimos que la proteína NS5 también se pegaba a proteínas del spliceosoma (ver el Capítulo 1) de

la célula, cosa totalmente inesperada. Lo interesante de nuestros resultados es que descubrimos que el virus del dengue interfiere con la maquinaria del *splicing* de la célula y modifica la expresión de proteínas celulares que participan en la respuesta antiviral innata. De esta forma encontramos un nuevo mecanismo que usa el dengue para evadir el ataque de la célula y ganar la batalla.

Una vez que se establece el ida y vuelta de ataque y contraataque, si el virus logra desactivar exitosamente a la respuesta antiviral innata de la célula, se multiplicará y diseminará en todo el organismo. Si bien se pierde la batalla, para la célula, la guerra aún no está perdida. Aquí comienza el segundo round en el que la célula, controlada por el virus, pide ayuda externa. De esta forma se pone en marcha una acción dirigida específicamente en contra del dengue. En esta segunda etapa participa el sistema inmune adaptativo del organismo. Este sistema, sumamente sofisticado, toma moldes de proteínas virales y produce anticuerpos específicos para neutralizar al virus. En esta segunda batalla, en general, el virus del dengue pierde. El tema es que nunca se sabe de antemano si perderá o no ya que depende de muchos factores, entre ellos que la persona infectada con síntomas, fiebre o hemorragias, reciba la atención sanitaria necesaria mientras se desata la guerra en su propio cuerpo.

Ahora bien, todo esto ocurre en una persona infectada pero... ¿Qué pasa cuando el virus infecta a las células de un mosquito? Seguramente han escuchado decir que el mosquito es el «vector» del dengue. Es decir, que es quien lo transmite. Esto es cierto, claro, pero no del todo. El mosquito también se infecta con el dengue. No es un vector pasivo sino que también es un hospedador para el virus. Cuando el virus infecta a una célula de mosquito, se multiplica y se disemina para llegar a las glándulas salivales. De esta forma, cuando un mosquito infectado pica a una persona, deposita micro gotas de saliva con virus que llegarán al torrente sanguíneo de esa persona y así se transmitirá el virus. Volvamos al mosquito. Una vez que el virus entra a una célula del insecto, pasa algo parecido a lo que vimos en células humanas: toma el control de la célula para multiplicar sus componentes y se gatilla la respuesta antiviral innata, ahora del mosquito. El mosquito

tiene varios sistemas inmunes innatos pero el más importante para enfrentarse a los virus es el sistema de ARN de interferencia. ¿De qué se trata esto? Las células del mosquito detectan la infección y utilizan a las moléculas del genoma viral para producir pequeñas moléculas de ARN que se acumulan adentro de las células. Estas pequeñas moléculas se usan para encontrar al genoma viral dentro de la célula y destruirlo. Recuerden que encontrar al genoma viral en la célula es como encontrar a una aguja en un pajar. Pero esas pequeñas moléculas de ARN son copias de fragmentos de la información genética del virus, que están sólo en su propia cadena de ARN. Esos ARN pequeños se cargan en proteínas celulares que buscan al genoma viral, y cuando lo encuentran, lo cortan en fragmentos hasta inutilizarlo. Sin genoma viral no habrá infección. Así el mosquito logra controlar la infección (Figura 4).

No se imaginarán que esto termina acá. Claro que no. Por supuesto que los virus evolucionaron estrategias para escaparse al sistema de ARN de interferencia. Un mecanismo común de escape consiste en la capacidad de cambiar o mutar que tienen los virus. Además de este mecanismo general, hay numerosos ejemplos de proteínas de distintos virus que funcionan como señuelos para engañar al sistema de interferencia del mosquito. Sin embargo para el dengue aún no sabemos si existe una proteína específica que ayude a evadir al sistema de ARN de interferencia. En la actualidad hay varios laboratorios en distintas partes del mundo trabajando en esta incógnita. Lo que sí sabemos es que el virus del dengue nunca llega a dañar o enfermar al mosquito. Un mosquito infectado con dengue convive con el virus durante toda su vida. Se dice que el mosquito está persistentemente infectado. O sea que en este caso no hay un ganador y un perdedor. Nos enfrentamos al resultado de miles de años de evolución y, como los virus de ARN evolucionan mucho más rápido que los mosquitos podríamos decir que éstos no ganan porque no les conviene ganar. Es cuestión de estrategia. El virus del dengue no daña al mosquito porque lo utiliza para diseminarse. Frente a esta asociación entre el virus y el mosquito, uno podría preguntarse cuál es en realidad nuestro peor enemigo, si el virus del dengue o el mosquito que lo protege y lo dispersa.

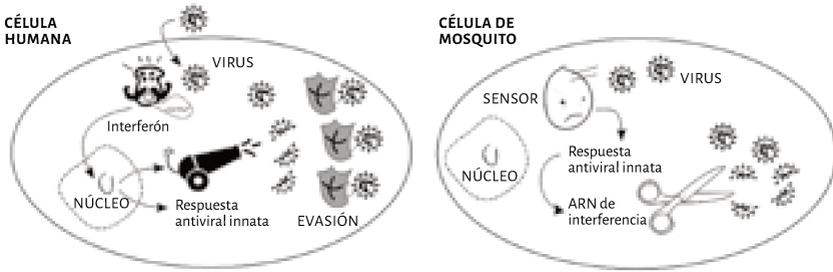


FIGURA 4. Cuando el virus del dengue infecta una célula humana, crecen las concentraciones de interferón, en señal de alarma de la infección. Esa señal desencadena cambios en la expresión de ciertos genes para activar la respuesta antiviral innata. El virus a su vez puede activar mecanismos de defensa y evasión de la respuesta celular, desatando una verdadera batalla entre el virus y el hospedero, pudiendo conducir a la muerte celular. En la célula del mosquito, la infección es reconocida por sensores específicos que van a activar la producción de ARN pequeños conocidos como ARN de interferencia. Estas moléculas van a reconocer específicamente al genoma viral para cortarlo y destruirlo. La infección sin embargo persiste y el virus no mata a la célula del mosquito, ni ésta logra eliminarlo totalmente.

De esta forma la guerra entre el virus y las células tiene un final anunciado en el caso del mosquito pero en humanos es mucho más incierto. El final dependerá no sólo de los mecanismos de defensa de la célula y del organismo, que ya vimos, sino que también influirán las políticas de salud pública que deberán actuar a tiempo.

LA DIVERSIDAD SIEMPRE ES BENEFICIOSA... HASTA EN LAS POBLACIONES VIRALES

Si llegamos hasta acá aprendimos que el virus del dengue alterna en forma natural entre humanos y mosquitos. También aprendimos que los sistemas de defensa antivirales de humanos y mosquitos son diferentes. Interferones en los primeros y ARN de interferencia en los segundos. Muy bien, a esto le podemos agregar que los virus de ARN evolucionan rápidamente. Paremos aquí un momento. ¿Qué quiere decir esto? Los virus de ARN mutan constantemente. Es decir que cambian partes de su genoma. Esto se debe, entre otras cosas, a que la polimerasa del virus comete errores cuando copia al genoma viral.

A ver... el genoma viral tiene once mil nucleótidos, o sea una seguidilla de once mil eslabones formados por las cuatro letras del código genético en un orden definido. Que la polimerasa copie al genoma significa que tiene que colocar una por una esas once mil letras. Parece un trabajo monstruoso pero lo hace en unos minutos. En ese proceso las polimerasas virales cometen errores, una vez cada tanto en forma aleatoria ponen la letra equivocada. En el caso del dengue podemos decir que cada vez que la polimerasa copia a un genoma entero comete un error. Estamos hablando del error de una letra cada once mil letras colocadas correctamente. Parece poco pero es muchísimo. Esto quiere decir que si un virus infecta a una célula y se producen mil virus, serán todos distintos. Cada genoma tendrá al menos una mutación con respecto al genoma que se usó para su copiado. Bueno, llegamos a donde queríamos llegar. Los virus de ARN existen en poblaciones muy diversas donde es muy difícil encontrar a dos virus con genomas exactamente iguales. A esta complejidad diversa de las poblaciones virales se la conoce con el nombre de «cuasiespecie». Ésta es una de las propiedades más temerarias de los virus de ARN.

La diversidad de las poblaciones virales ofrece ventajas para que el virus pueda adaptarse a ambientes adversos, ya sea para enfrentarse al sistema inmune de la célula, escaparse a un antiviral, o poder saltar de una especie hospedadora a la otra. Esto se debe a que al tener una población de virus con miembros que tienen propiedades diferentes, siempre hay uno que estará mejor dotado para resolver el problema. Ese miembro de la población se seleccionará, aumentará su proporción en la población, y podrá sobrellevar la situación adversa. En relación a este tema, en nuestro laboratorio investigamos cómo son las poblaciones del virus del dengue que se encuentran en humanos y mosquitos. ¿Son iguales o diferentes? Para estudiar esto secuenciamos cientos de miles de genomas virales que obtuvimos de mosquitos o de células humanas infectadas. Así descubrimos enormes diferencias entre estas poblaciones. Lo sorprendente fue que podíamos ver cómo los miembros de la población (recuerden que estamos hablando de virus) cambiaban cíclicamente cuando pasaban de mosquito a humano o de humano a mosquito. Lo interesante es

que las mutaciones que aparecían y se seleccionaban, ya que daban una ventaja para infectar mosquitos, eran perjudiciales en la infección de células humanas. Cuando analizamos qué parte del genoma cambiaba en cada caso, encontramos que había una región específica que concentraba gran parte de las mutaciones seleccionadas. Llevando adelante estudios empleando clones de virus, o sea separando los miembros de la población y estudiando las ventajas que tenía cada uno de los miembros de la misma, descubrimos que las mutaciones que aparecían en mosquito (que eran perjudiciales para infectar humanos) no permitían que el virus bloquee al interferón. Esto fue fantástico porque sin buscarlo encontramos partes del genoma del virus que eran reconocidos por el sistema inmune innato para gatillar la respuesta al interferón. Claro, esa parte del genoma no tenía la misma función en el mosquito porque la respuesta innata es diferente, por eso cambiaba sin problema. Pero al volver a la célula humana no quedaba otra que recuperar a esos miembros de la población que hacían bien ese trabajo. El mecanismo de recuperar a esos miembros era justamente seleccionando virus que no tenían esas mutaciones, restableciendo la capacidad de escaparse del interferón. Así aprendimos que el virus del dengue cambia la composición de la población para contrarrestar eficientemente dos respuestas antivirales diferentes y poder pasar de mosquitos a humanos (Figura 5). Estos experimentos, diseñados originalmente para estudiar a las poblaciones

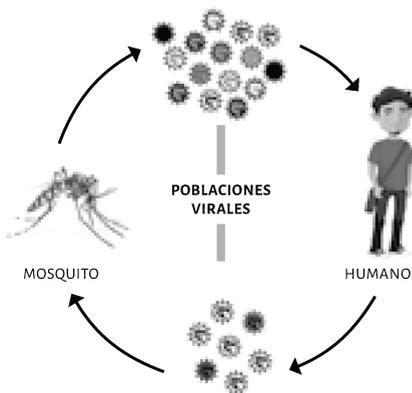


FIGURA 5. La composición de las poblaciones del virus del dengue es diferente al multiplicarse en el mosquito o en el humano. Las mutaciones seleccionadas durante el paso por cada organismo están relacionadas con características que le resultan beneficiosas al virus para la infección. Por ejemplo, ciertos genomas virales son más eficientes para bloquear la acción del interferón humano, y son seleccionados. Sin embargo, esa presión selectiva se pierde cuando la misma población luego infecta un mosquito, por lo que varía nuevamente su composición.

virales, nos permitieron descubrir mecanismos de adaptación del virus del dengue que son importantes para la transmisión de mosquito a humanos. Este descubrimiento nos permite apreciar que a veces es muy difícil predecir qué es lo que vamos a aprender a partir de nuestras investigaciones. Lo importante es tener buenas preguntas, responderlas con rigurosidad y tener la cabeza abierta para recibir respuestas inesperadas.

CÓMO ENFRENTARSE AL DENGUE: LA UNIÓN HACE LA FUERZA

El problema del dengue es complejo de controlar. En las últimas décadas se registró un aumento sostenido en el número de casos reportados en el continente americano. Se pasó de alrededor de 100 mil infecciones por año, a más de 2 millones. Las posibilidades de que se revierta la tendencia de aumento de infecciones y se frene la expansión geográfica del dengue no son prometedoras. En la mayor parte del continente americano no se aborda la problemática del dengue en forma integral. Hasta el momento, la estrategia de emplear programas de control del mosquito no ha sido exitosa, en gran parte debido a la íntima asociación del mosquito con la pobreza. Teniendo en cuenta la profundización de la desigualdad social y económica en nuestra región, es difícil pensar en la eliminación del mosquito. Por supuesto el verdadero desafío es eliminar la pobreza, pero ese tema escapa al alcance de este capítulo. Si bien se han intensificado las actividades de vigilancia del *Aedes Aegypti* en toda la región, el esfuerzo no ha sido suficiente. Es indispensable un trabajo integral que incluya a distintas disciplinas científicas.

Como decíamos, para controlar el problema del dengue es necesario un trabajo multidisciplinario. Nos urge entender a nivel molecular la biología del virus y la enfermedad que causa. Es imprescindible contar con estudios epidemiológicos que describan qué serotipos del virus circulan en cada lugar. Además es importantísimo conocer el comportamiento y la ecología del mosquito, saber por qué algunos mosquitos transmiten al virus y otros no. Se necesitan expertos en

matemática para desarrollar modelos que puedan analizar y predecir posibles brotes. Un tema fundamental es contar con profesionales de la salud preparados para reconocer, diagnosticar y tratar a las personas infectadas en forma rápida. Sobre esto, es importante saber que el dengue causa una enfermedad aguda, lo que requiere de toma de decisiones médicas en pocos días. Sólo la unión y la coordinación del trabajo de expertos en todas las áreas mencionadas permitirán resolver la problemática del dengue. Sin duda debe haber una decisión política de impulsar este trabajo integral.

La Organización Mundial de la Salud estima que hoy aproximadamente un tercio de la población mundial está en riesgo de contraer dengue. Esto pone en perspectiva la magnitud del problema del que estuvimos hablando.

GENES DESREGULADOS Y CÉLULAS REBELDES: EL ESCAPE DE LOS TUMORES

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE
GENES DURANTE EL ESCAPE TUMORAL:
IMPLICANCIAS EN INMUNOTERAPIA

GABRIEL A. RABINOVICH y ADA G. BLIDNER*

CÉLULAS JUGANDO AL POLICÍA Y AL LADRÓN

La transformación maligna de un grupo de células que lleva a la generación de tumores es sin duda uno de los procesos más complejos y desafiantes de la biología. Los eventos celulares que subyacen a este proceso emergen de alteraciones genéticas que en conjunción con señales provenientes del microambiente de esas células, dictaminan el crecimiento y progresión de un tumor. Un desajuste, un error que no puede ser reparado, conlleva a la amplificación y desinhibición de señales de crecimiento de células que aspiran a dominar tierras

* Gabriel Rabinovich es Investigador Superior del CONICET y Profesor Titular de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Actualmente es Vice-Director del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME/CONICET). Su trabajo de investigación está dedicado a los mecanismos de resistencia tumorales y el desarrollo de inmunoterapias. Durante su carrera, Gabriel ha sido galardonado con numerosos premios, incluido el Premio Investigador de la Nación Argentina (2017), Premio Houssay Trayectoria (2017), Premio Konex Platino (2013), John Simon Guggenheim Foundation Award (2006), Cancer Research Institute (USA 2006), TWAS Prize on Medical Sciences (2010), Premio Consagración de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (2018) y el American Association of Immunologists Career Award (USA 2017). Además, es miembro de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos (NAS), Academia de Ciencias para Países en Desarrollo (TWAS), Academia Nacional de Ciencias de Argentina y Personalidad Destacada de ciudades a lo largo y a lo ancho del país.

Ada Blidner es Investigadora Asistente del CONICET y forma parte del grupo del Dr. Rabinovich. Su trabajo de investigación recibió el apoyo de la Sociedad de Inmunoterapia del Cáncer (SITC Fellowship Award 2016).

vecinas y conquistar lejanas. Cuando estas células rebeldes generan estrategias para camuflarse y evadir la vigilancia de nuestro sistema inmunológico, es cuando hablamos de «escape tumoral».

Nuestra respuesta inmunológica ha co-evolucionado durante años con los microbios que nos rodean: virus, bacterias, parásitos y hongos. Si hoy estamos vivos y sanos es porque logramos defendernos, eliminarlos o convivir con ellos. ¿Pero qué sucede cuando son las células de nuestro organismo las que se transforman y se rebelan? Nuestro sistema inmunológico monitorea constantemente que las proteínas presentes en la superficie de las células (llamadas antígenos) sean normales. En la mayoría de los casos, cuando las células de nuestras defensas (llamadas linfocitos) reconocen células malignas que expresan neoantígenos (es decir, nuevos antígenos), las eliminan. Estos neoantígenos aparecen por la desregulación de la expresión de ciertos genes. Sin embargo, durante procesos de carcinogénesis, es decir, el desarrollo de un cáncer, las células tumorales también evolucionan y se seleccionan las variables resistentes a nuestro sistema inmunológico, resultando invisibles al monitoreo de control. Entonces, son capaces de invadir el torrente sanguíneo y linfático y colonizar nuevos tejidos. Este proceso denominado metástasis involucra la expresión o silenciamiento de una gran variedad de genes asociados a procesos de extravasación (o pasaje de un torrente a otro), migración celular, invasividad, modificación del sistema vascular y escape inmunológico.

La identificación de los mecanismos celulares y moleculares utilizados por células tumorales para eludir el sistema inmunológico llevó al desarrollo de nuevas terapias para el cáncer, las cuales hoy denominamos estrategias de inmunoterapia. Cuando un tumor emite señales que apagan al sistema inmune, hablamos de mecanismos inmunosupresores. Las inmunoterapias tienen como objetivo potenciar las propias defensas del organismo e inhibir los mecanismos inmunosupresores de los tumores, generando un enorme impacto en la expectativa de vida libre de enfermedad en pacientes carentes de otras opciones terapéuticas.

A continuación, haremos un recorrido histórico acerca de cómo fuimos explorando y comprendiendo cómo funcionan los mecanismos asociados al escape tumoral y la respuesta inmunológica

en cáncer. En este contexto, describiremos investigaciones de nuestro laboratorio asociadas a las galectinas, una familia de proteínas altamente conservadas a través de la evolución con importantes implicancias en la progresión tumoral, metástasis, vascularización e inhibición de la respuesta inmunológica. Estos descubrimientos, producto de los esfuerzos en investigación básica, han sido clave para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer.

INMUNOVIGILANCIA EN CÁNCER, UN POCO DE HISTORIA

La estimulación del sistema inmunológico para el tratamiento del cáncer tiene sus orígenes hacia finales del siglo XIX. Fue gracias al médico norteamericano William Coley, quien a pesar de no comprender en detalle los fundamentos de la respuesta inmunológica, utilizaba toxinas derivadas de las bacterias *Streptococcus erysipelas* y *Bacillus prodigiosus* para el tratamiento de un tipo de cáncer llamado sarcoma, que era inoperable. La inflamación local producida por estas toxinas era suficiente para reactivar la respuesta inmunológica y reducir el tamaño de tumores en sus pacientes. Estas primeras observaciones sentaron las bases de lo que en la actualidad se considera una revolución en el tratamiento del cáncer. Es por ello que William Coley es considerado por muchos, el padre de la inmunoterapia. En 1909 Paul Ehrlich predijo que el sistema inmunológico podría prevenir la aparición de tumores que de otra manera, serían mucho más frecuentes. Esta idea fue retomada por Frank Macfarlane–Burnet y Lewis Thomas entre los años 50s y 70s, quienes postularon la teoría de inmunovigilancia, por la cual células tumorales podían ser distinguidas de células normales a partir de moléculas extrañas expresadas en su superficie (los neoantígenos) capaces de desencadenar una respuesta inmunológica.

ACELERADORES Y FRENOS DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO: PUNTOS DE CONTROL INMUNOLÓGICO

La activación del sistema inmunológico frente a un tumor involucra una secuencia de diferentes eventos celulares y moleculares. Todo

comienza con el encuentro de una célula de nuestro sistema inmunológico, llamada célula dendrítica (célula presentadora de antígenos profesional) con la célula potencialmente maligna y el reconocimiento de sus antígenos extraños. Una vez que ocurre este reconocimiento, la célula dendrítica viaja a los ganglios linfáticos donde se encuentra con los linfocitos T vírgenes, les presenta los antígenos tumorales y desencadena su activación. Ahora estos linfocitos activos saben qué células deben buscar en el organismo para eliminarlas. Pero la activación del linfocito T es aún más compleja, ya que necesita además de reconocer la molécula extraña, un acelerador. Así como cuando conducimos un automóvil, el embrague es la primera señal para que el vehículo pueda avanzar, pero sólo logramos moverlo cuando presionamos el acelerador. El embrague es entonces la proteína extraña, o antígeno, y el acelerador son otras moléculas presentes en la membrana del linfocito T que facilitan su activación, su migración al sitio de crecimiento tumoral y la eliminación de dichas células anormales. Estos aceleradores se llaman moléculas co-estimuladoras, dado que ayudan a estimular nuestras defensas.

Pero de la misma manera que en un semáforo en rojo debemos frenar el vehículo, los linfocitos T también deben detener su activación una vez que se eliminó el tumor, para lo cual poseen otras moléculas en su superficie, llamadas moléculas co-inhedoras. Estas moléculas constituyen un freno para la respuesta inmunológica anti-tumoral y una barrera que impide la activación sostenida del linfocito T, que podría resultar dañina para nuestro organismo.

LAS INMUNOTERAPIAS COMO ESTRATEGIA CONTRA EL DESARROLLO DE TUMORES

A partir de sucesivos descubrimientos que la ciencia básica fue alcanzando en las últimas décadas, hemos logrado identificar muchas de las moléculas co-estimuladoras y co-inhedoras de los linfocitos T. Con el armado parcial de este enorme rompecabezas, hemos comenzado a comprender mejor cómo los tumores modulan la actividad de estas moléculas co-activadoras o co-inhedoras. De esta manera,

muchos tumores consiguen evadir o apagar el sistema inmunológico, y así lograr progresar e incluso invadir nuevos tejidos. El objetivo de las inmunoterapias consiste justamente en interferir en los planes del tumor, mejorando el balance entre la activación y la represión de las células de nuestras defensas para reconocer y eliminar las células malignas.

En 1987 se identificó por primera vez el gen correspondiente a la molécula co-inhibitoria CTLA-4 (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*). Luego, durante 1990 James Allison junto a su equipo de la Universidad de California en Berkeley, estudió su función inmunosupresora en el microambiente tumoral. Es decir, el tumor usa a la molécula CTLA-4 como señal para apagar o frenar a los linfocitos T. Si bien no fue el único grupo que identificó la capacidad inmunosupresora de esta molécula, Allison y colaboradores fueron los primeros en fabricar un anticuerpo neutralizante que bloqueaba la función de esta proteína con el fin de estimular los linfocitos anti-tumorales. En 1994 los investigadores realizaron el primer experimento en ratones portadores de tumores en el cual observaron una reducción completa del tumor cuando estos animales eran tratados con el anticuerpo anti-CTLA-4. El bloqueo de la actividad inhibitoria de esta molécula permitió activar linfocitos T liberando los frenos de la respuesta inmune antitumoral. A pesar del escepticismo inicial acerca del impacto clínico de estos hallazgos, Allison siguió su camino intentando convertir su descubrimiento en una terapia efectiva para pacientes con cáncer. En el año 2010 se reportaron resultados clave en ensayos clínicos en pacientes con melanoma avanzado revelando respuestas antitumorales muy positivas en un grupo de pacientes con este tipo de tumor agresivo de piel. Estos resultados sin precedentes en pacientes con melanoma avanzado, dieron comienzo a una nueva era en la terapia del cáncer: «la era de la inmunoterapia». La utilización de anticuerpos monoclonales neutralizantes de CTLA-4 fue aprobada por las autoridades regulatorias en el año 2011 para el tratamiento de melanoma metastásico. Si bien esta terapia fue exitosa sólo en un 30% de los pacientes, las respuestas obtenidas en aquellos individuos que respondieron al tratamiento fueron sumamente duraderas.

De hecho, aproximadamente el 22% de los pacientes con los que se hicieron los primeros ensayos clínicos, se mantuvieron libres de enfermedad por más de 10 años. Los efectos adversos de esta terapia se hallan relacionados con la activación sostenida de linfocitos T, por lo cual algunos pacientes pueden experimentar eccemas en la piel, irritación intestinal y problemas hormonales. Estos síntomas indeseados son consecuencia de la inflamación exacerbada y daño de tejidos mediado por la respuesta inmunológica descontrolada que comienza a reaccionar contra el propio organismo. Sin embargo, estos efectos adversos, a diferencia de una enfermedad autoinmune clásica, pueden revertirse con el cese de la terapia y controlarse con la administración de corticoides u otros agentes inmunomoduladores. En función de estos descubrimientos, la Academia Sueca otorgó a James Allison el Premio Nobel en Medicina en el año 2018.

En 1992, el investigador japonés Tasuku Honjo descubrió que la proteína PD-1, originalmente relacionada al proceso de muerte programada de linfocitos T (de allí su nombre, *Programmed Cell Death Protein-1*), era una molécula co-inhibitoria presente en la superficie de linfocitos T, que actúa como receptora de señales. A principios del año 2000, en colaboración con Tasuku Honjo, los investigadores Arlene Sharpe, Gordon Freeman y Lieping Chen encontraron que las células tumorales expresaban moléculas capaces de interactuar con PD-1, a los que llamaron PD-L1 y PD-L2 (la L se refiere a «ligando», que es la manera en la que llamamos a las moléculas que son reconocidas por proteínas receptoras como PD-1). Estas moléculas funcionan como el pie que pisa el freno para desactivar a los linfocitos T, evitando que estos eliminen al tumor. Es decir, cuando un linfocito T reconoce a una célula maligna, ésta es capaz de apagarlo mediante la interacción PD-L1 y 2 con PD-1. Muy rápidamente se demostró que el bloqueo de la interacción entre PD-1 y PD-L1 era efectivo en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

Si bien el bloqueo de CTLA-4 fue el puntapié inicial que demostró los beneficios clínicos de la inmunoterapia en pacientes por inhibición de moléculas co-inhibitorias (llamados actualmente puntos de control inmunológico), hoy en día su uso es más limitado que el

bloqueo de PD-1. Por lo tanto, y dado que el bloqueo de PD-1 permitió la inhibición del crecimiento y metástasis en numerosos tipos de cáncer, se convirtió en la estrategia de inmunoterapia por excelencia en un gran número de tumores. El descubrimiento de PD-1 y su función co-inhibitoria le confirió a Tasuku Honjo el honor de recibir el Premio Nobel en Medicina junto a su colega James Allison en 2018.

En los últimos años, una variedad creciente de moléculas co-activadoras y co-inhibidoras han sido descubiertas, caracterizadas e incluso algunas de ellas están siendo contempladas como nuevos blancos de inmunoterapias. Tim-3, LAG-3, TIGIT, CD73, VISTA e IDO son algunas de las moléculas en estudio para diferentes tipos de cáncer. El desarrollo de anticuerpos o agentes capaces de bloquear las señales con las que el tumor apaga al sistema inmune, permitiría que nuestras defensas se activen y reduzcan o eliminen al tumor (Figura 6). Muchos de estos descubrimientos y desarrollos están siendo actualmente analizados en ensayos clínicos, demostrando diferentes grados de eficacia en los tratamientos.

GALECTINAS: NUEVOS BLANCOS TERAPÉUTICOS EN CÁNCER

En las secciones anteriores describimos la función de receptores inhibitorios producto de la expresión regulada de diversos genes en el microambiente tumoral, que al contactar con sus ligandos o interactores proteicos, desencadenan señales negativas sobre la activación y proliferación de linfocitos T. Sin embargo, existen vías alternativas de regulación que se basan en el reconocimiento entre proteínas y glicanos (azúcares). Los glicanos forman parte de muchas proteínas (glicoproteínas) y de grasas o lípidos (glicolípidos), presentes en la membrana celular y en el exterior de las células. La combinación de las distintas estructuras de glicanos asociados a las proteínas de la superficie de los linfocitos T, influyen sobre su destino, ya sea su activación, diferenciación, migración e incluso su muerte. Este proceso de reconocimiento es mediado, al menos en parte, por proteínas que las células tumorales y aquéllas que las rodean liberan a su entorno, denominadas galectinas. El protagonismo de las galectinas en la

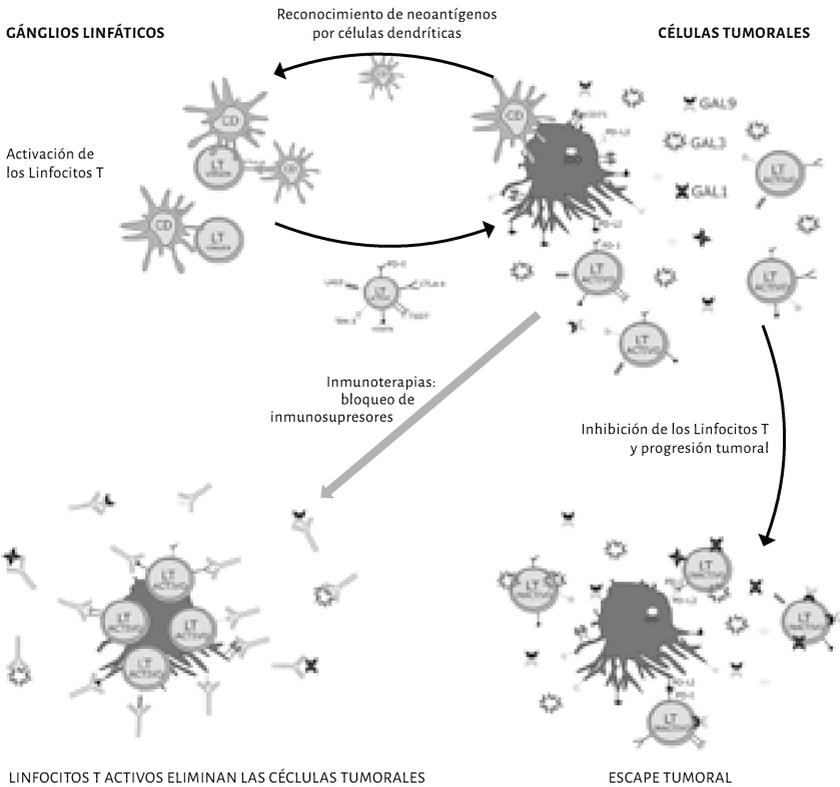


FIGURA 6. Mecanismos de escape tumoral en cáncer. El microambiente de las células tumorales despliega una variedad de estrategias de escape a través de la expresión de moléculas inhibitorias (PD-L1/2, CD73, IDO, VISTA, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT) que inducen la inhibición de los linfocitos T (LT), y modulan la actividad de diversas células de la defensa que no se incluyeron en la figura. En su conjunto, estos eventos inmunosupresores favorecen el crecimiento y progresión de tumores. Las células dendríticas (CD) reconocen los neoantígenos de las células tumorales y viajan a los ganglios linfáticos donde activarán a los linfocitos T. A su vez, la expresión de CTLA-4 en los linfocitos T presentes en los ganglios linfáticos inhibe su activación. Las galectinas se suman como nuevos puntos de control capaces de inhibir la eficacia de la respuesta antitumoral. Las inmunoterapias se basan en el bloqueo de los inmunosupresores haciendo uso de anticuerpos específicos. De esta manera, los linfocitos T permanecen activos y capaces de eliminar las células tumorales.

progresión y el escape tumoral ha sido establecido en numerosas publicaciones y validado en distintos tipos de cáncer como melanoma, linfoma Hodgkin, neuroblastoma, cáncer de mama, pulmón y páncreas. Aunque existen 15 miembros en la familia de las galectinas, 3 de ellos juegan un papel relevante en el escape tumoral: la galectina-1, la -3 y la -9. Del mismo modo que las moléculas co-inhedoras citadas previamente, las galectinas liberadas por el tumor son capaces de suprimir la respuesta inmunológica utilizando distintas estrategias. Galectina-1 se une a ciertas glicoproteínas de los linfocitos T activados, promoviendo su disfunción. Tanto galectina-1 como galectina-9 promueven la muerte selectiva de algunos linfocitos T, involucrados también en patologías autoinmunes, además de favorecer el escape tumoral. Por otro lado, se ha demostrado que galectina-1 es capaz de unirse a otras células de defensa (células dendríticas), haciéndolas más tolerantes ante el reconocimiento de neoantígenos tumorales y facilitando fenómenos anti-inflamatorios y de inmunosupresión. El interés que cobraron las galectinas como nuevos blancos terapéuticos en cáncer, no sólo se debe a su capacidad inmuno-inhedoras, sino también a efectos independientes del sistema inmunológico, tales como angiogénesis tumoral (formación de nuevos vasos sanguíneos que nutren al tumor) y metástasis. En este sentido, observamos que galectina-1 promueve la resistencia a las terapias anti-angiogénicas convencionales contra el cáncer. De esta manera, el bloqueo de galectina-1 logró contrarrestar la resistencia a la terapia anti-angiogénica. Dado el papel protagónico de las galectinas en el crecimiento y progresión de tumores, su bloqueo mediante anticuerpos neutralizantes emerge como una posible estrategia terapéutica para enriquecer el panorama de los tratamientos actuales.

PERSPECTIVAS Y DESAFÍOS

La inmunoterapia ha generado una revolución en el tratamiento del cáncer. Las aplicaciones de estos nuevos tratamientos son muy promisorias; sin embargo aún no se ha logrado que su eficacia clínica supere el 30-50 % de los pacientes tratados. En gran parte, esta

limitación radica en la complejidad del microambiente del entorno del tumor ya que, como describimos en este capítulo, existen numerosos genes involucrados en el escape inmunológico. De este modo, el bloqueo de mecanismos individuales de inmunosupresión puede llevar a la activación de otros mecanismos alternativos que le confieren al tumor una ventaja adaptativa. Los esfuerzos actuales se hallan destinados a dos objetivos fundamentales:

- a)** Determinar qué mecanismos de escape (genes inhibitorios diferencialmente expresados) se hallan presentes en tumores individuales de cada paciente y
- b)** Combinar el bloqueo terapéutico de dos o más puntos de control inhibitorios. Estos aspectos representan objetivos clave de lo que conocemos como «Medicina de Precisión», es decir, el diseño de un tratamiento específico para las características de cada paciente.

Desde nuestro equipo de trabajo proponemos, a través de la exploración de mecanismos celulares y moleculares involucrados en el efecto inmunorregulatorio de las galectinas, aportar conocimientos fundamentales que permitan el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas en cáncer y enfermedades autoinmunes. Nuestros resultados en modelos preclínicos demuestran que el bloqueo de galectina-1 potencia la respuesta inmunológica, inhibe programas de vascularización y suprime la progresión tumoral en un amplio espectro de tumores. La posibilidad de transferir estos hallazgos para el beneficio de pacientes, sólo será posible a partir del esfuerzo conjunto de investigadores y médicos, además de un Estado y una sociedad que apoyen la investigación básica y su conexión con la transferencia tecnológica y la salud pública.

HAY GENES EN MI ALMUERZO

¿QUÉ SABEMOS SOBRE LAS PLANTAS
NATURALES, MEJORADAS Y TRANSGÉNICAS?
MITOS Y CERTEZAS SOBRE NUESTRO
ALIMENTO, NUESTRA VESTIMENTA, NUESTRO
OXÍGENO, NUESTRO PAPEL, NUESTROS
MUEBLES Y NUESTROS MEDICAMENTOS.

RAQUEL L. CHAN*

LAS PLANTAS HACEN FOTOSÍNTESIS Y TAMBIÉN RESPIRAN

Las plantas son seres vivos que no pueden trasladarse como lo hacen los animales pero son capaces de hacer fotosíntesis. Son descendientes evolutivas de las algas verdes, también capaces de hacer fotosíntesis pero a diferencia de estas últimas las plantas son pluricelulares, o sea están compuestas por muchas células que forman distintos tejidos y órganos. Habitan la tierra y hay muchísimas especies distintas. Todos los años se registran especies nuevas y desaparecen otras (<https://stateoftheworldplants.org/>).

La fotosíntesis es un proceso metabólico que permite a estos maravillosos seres vivos convertir energía lumínica (luz solar) en energía química, más concretamente en hidratos de carbono, o azúcares, que son la fuente directa e indirecta de toda nuestra alimentación. Este proceso se produce en unas estructuras que están en los tejidos verdes de las plantas, los cloroplastos. Pero las plantas también tienen

*Raquel Chan es Investigadora Superior del CONICET y Profesora Titular de la Universidad Nacional del Litoral. Actualmente es Directora del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL/CONICET). Su trabajo de investigación gira en torno a los factores de transcripción de plantas, y ha sido pionera en el desarrollo de la agrobiotecnología nacional. Durante su carrera, fue galardonada con numerosos premios, incluidos el Diploma de Mérito de la Fundación Konex y el Premio Jorge Sábato en 2013.

otras estructuras en sus células que se llaman mitocondrias, también existentes en los animales, y en ellas se produce la respiración celular. Durante la fotosíntesis la luz solar es captada por moléculas específicas en el cloroplasto y se utiliza para generar enlaces químicos en moléculas de azúcar a partir del dióxido de carbono del aire. Como producto secundario de este proceso, se genera oxígeno molecular a partir del agua. Sí, los organismos fotosintéticos son los únicos capaces de «partir» una molécula de agua en sus componentes: hidrógeno y oxígeno. Ese oxígeno se libera al ambiente pero parte de él es utilizado por las mismas plantas para respirar. La respiración es un proceso necesario para todos los seres vivos pluricelulares del cual obtienen energía. El balance entre el oxígeno liberado y el captado por las plantas es positivo, o sea que liberan más de lo que toman. Sin embargo, los mayoritarios dadores de oxígeno en el planeta son las algas y bacterias fotosintéticas que habitan el mar. No es que sean más eficientes, son más. Sólo durante el día, con luz solar, las plantas producen oxígeno mientras que tanto de día como de noche, respiran.

LOS USOS DE LAS PLANTAS

No caben dudas de que no estaríamos sobre la tierra, ni los seres humanos ni ningún animal, si no fuera por y gracias a las plantas. Los animales somos seres heterotróficos, lo que quiere decir que no producimos nuestros propios alimentos por mucho que trabajemos varias horas por día. Nuestro alimento, así comamos sólo carne, proviene de las plantas que son el alimento de los animales. Pero no se acaba en el alimento diario la utilidad de las plantas para los seres humanos. Utilizamos los árboles leñosos para obtener madera y papel. En algunas regiones del trópico, las casas se hacen con bambúes o palmeras. Las fibras de algodón, lino o cáñamo se utilizan para hacer vestimentas. El petróleo deriva de biomasa de plantas acumuladas y fosilizadas. También alegran nuestros días como ornamentos y se utilizan para producir cientos de medicamentos, algunos considerados «modernos» como la aspirina que se extraía originalmente de la corteza del sauce.

No todas las plantas son buenas para los humanos; también hay plantas dañinas, venenosas, plagas y malezas.

MEJORAMIENTO DE PLANTAS PARA EL USO HUMANO

Es por su amplio uso para el ser humano que las plantas han sido mejoradas desde los inicios ancestrales de la agricultura aun con conocimientos nulos sobre genética y fisiología. ¿Cómo hacía el ser humano para mejorar las plantas? Simplemente elegía los individuos que tenían una característica buena como mejores hojas o más grandes y los cruzaba con otros que tuvieran otra característica benéfica como por ejemplo resistir mejor los vientos. Y así, por sucesivas cruces y selecciones se fueron obteniendo las plantas que están hoy en nuestra mesa que de «naturales» tienen bien poco. Una historia interesante es la del maíz, que no existía en la naturaleza y es producto de la domesticación del teosinte en el sur de México. Las imágenes de las plantas de teosinte hablan por sí solas; nadie las compraría en un mercado o las serviría en su mesa pero son los ancestros naturales de los ricos choclos que sí nos gustan comer (Figura 7).

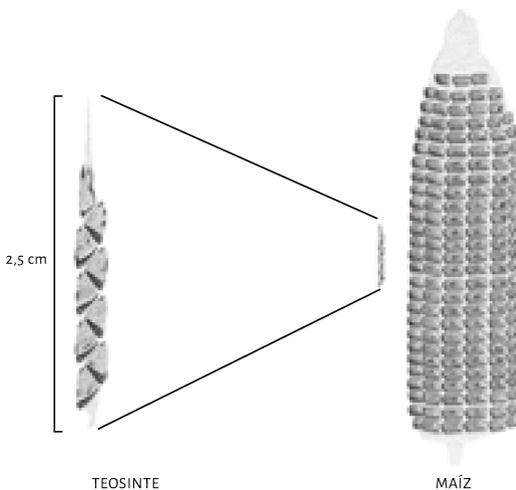


FIGURA 7. Comparación entre una espiga de teosinte, una especie natural, y un choclo. El maíz no existía en la naturaleza, sino que es producto de la domesticación del teosinte por el ser humano. Adaptado de Rodríguez Alonso y Arredondo Peter, Nota mínima, 2012.

MUCHOS MEJORAMIENTOS CLÁSICOS INVOLUCRAN FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN. ¿QUÉ SON ESTAS MOLÉCULAS?

Ahora que se sabe tanto más de genética, de bioquímica y de otras áreas de la ciencia, nos sorprendemos de que muchos de los mejoramientos hechos «a ciegas» por cruce y selección involucraron unas proteínas llamadas factores de transcripción. Para comprender qué son y qué hacen estas proteínas tenemos que entender que los seres vivos podemos cambiar nuestro metabolismo, que no es más que un conjunto de reacciones químicas y enzimáticas que se producen a la vez para producir las moléculas que necesitamos. Las plantas tienen mucha capacidad de adaptación, justamente porque ellas no se pueden trasladar. Pueden crecer más o menos en tamaño, desarrollar más o menos hojas, florecer antes o después, dar más o menos semillas, dependiendo del ambiente que las rodea y sus cambios. Pero, ¿cómo se dan cuenta de los cambios? Las plantas tienen moléculas «receptoras» que perciben la luz, la temperatura, la disponibilidad de agua, etc. y le transmiten esa información a las distintas células donde se van a activar o expresar los factores de transcripción, también llamadas proteínas reguladoras. Estas proteínas son llaves maestras que desencadenan con un efecto dominó la activación o inactivación de otros cientos de moléculas. De esta forma las plantas adaptan su desarrollo en función de las condiciones del ambiente, producen lo que necesitan y descartan lo que les sobra en cada ocasión con un objetivo invariable: sobrevivir.

Como lo que buscaban los mejoradores eran características morfológicas y fisiológicas benéficas y éstas involucran muchos genes, no es raro descubrir en nuestros días, con el estado del conocimiento actual, que estas plantas hayan sido seleccionadas y mejoradas en función de cambios en la expresión o la secuencia de sus factores de transcripción.

ANTES DE LA DOMESTICACIÓN, EL ARROZ ERA ROJO Y LOS GRANOS CAÍAN ANTES DE TIEMPO

El gen Rc de arroz codifica un factor de transcripción fundamental para la formación del pericarpio (envoltura de la semilla) de color

rojo. Ese color del grano está dado por una versión dominante del gen *Rc* mientras que existe una versión mutada de *Rc* que genera una molécula de ARN más corta, y por ende, una proteína más pequeña. Cuando la planta de arroz sólo tiene copias del gen *Rc* mutante, el color rojo se pierde y los granos son blancos. *Rc* es un regulador positivo de la producción de antocianinas, moléculas que cumplen muchas funciones en las plantas, y tienen la particularidad de verse de color rojo, como el repollo colorado o la cáscara de la berenjena. Sin embargo, el arroz que comemos es blanco, producto de la generación de un transcrito trunco del gen *Rc*. Esta mutación ocurrió naturalmente y el hombre seleccionó las plantas mutantes sin saber de genes ni antocianinas, ni mucho menos de factores de transcripción.

Otro factor de transcripción que tuvo un papel importante en la domesticación del arroz es el codificado por el gen *qSH1* que cuando está mutado pierde la función de la caída de granos. Ese arroz (con el gen *qSH1* mutado) fue seleccionado porque permite una cosecha completa, ya que naturalmente los cereales como el arroz tienden a dejar caer los granos tempranamente y en forma secuencial, impidiendo que sean recolectados todos a la vez.

LA TARTA DE CHOCLO

La domesticación del maíz implicó cambios muy significativos en la forma de las estructuras vegetativas y reproductivas de la planta. Mucho después de que los agricultores utilizaran el maíz con todos los cambios, varios grupos de investigación identificaron los genes responsables de esas modificaciones.

La arquitectura de las inflorescencias refleja el número de meristemas (células indiferenciadas) que se correlaciona con el largo de las ramas. Las inflorescencias de maíz domesticado carecen de ramificaciones largas.

El gen *RAMOSA1* de maíz controla la arquitectura de la inflorescencia de esta planta y se expresa cerca de la base del meristema en las plantas seleccionadas que tienen ramificaciones cortas mientras que las silvestres tienen ramificaciones largas, una característica que

complica el cultivo y la cosecha. Entonces, sin saberlo, los mejoradores han seleccionado individuos y desarrollado variedades de maíz con una expresión particular del gen *RAMOSA1*, en función de sus necesidades. Otra vez la cultura seleccionando genes.

LOS TRANSGÉNICOS ¿QUÉ SON?

En el siglo pasado aprendimos que la información genética estaba codificada en el ADN de la célula, y poco a poco hemos avanzado en la dilucidación de la función de un gran número de genes, aunque aún resta un sinnúmero de casos por caracterizar y más aún, por entender cómo está regulada su expresión. Sin embargo, el creciente conocimiento de los genes y genomas de seres vivos de todos los reinos, ha permitido diseñar y desarrollar organismos con fines particulares. Así fue que desde el final del siglo XX hemos logrado obtener bacterias transgénicas que expresan insulina humana, vacas transgénicas que expresan hormonas de crecimiento humano en su leche, y también algunos cultivos transgénicos, que generan gran controversia.

Para entender qué es un transgénico, hay que comprender primero qué es un gen y qué es un transgén. Como se describió en la Introducción a este libro, los seres vivos, animales, plantas, bacterias, hongos, etc. tenemos un gran número de genes que varía entre especies pero en los organismos complejos como las plantas ese número oscila entre los 20 y los 50 mil.

Un transgén es un gen que puede provenir de la misma planta o de otro ser vivo y se suma a los que ya tiene para darle una característica específica que persiga el ser humano. El gen en cuestión se introduce en la planta receptora por técnicas de laboratorio. La ventaja de esta técnica de mejoramiento es que se domina el sistema; en otras palabras se sabe exactamente qué es lo que se está cambiando. Esto no sucede en las técnicas de cruce y selección. ¿Para qué se hace esto? Para darle a la planta una característica de interés agronómico, por ejemplo que sea más tolerante al ambiente o que madure sus granos al mismo tiempo para permitir una cosecha más eficiente.

La ventaja esencial de esta estrategia es que se tiene un control

sobre la modificación, se espera un resultado dado basado en una hipótesis, se puede trabajar y avanzar a escala de laboratorio e invernáculo tanto con sistemas modelo (es decir, con plantas más sencillas pero de poco o nulo interés comercial o nutricional) como directamente con cultivos de interés agronómico. Los problemas de esta estrategia son las incertidumbres acerca de reproducir en el campo los resultados del laboratorio e invernáculo y de trasladar a los cultivos agronómicos los hallazgos realizados en plantas de laboratorio. La principal desventaja de esta estrategia consiste en la desfavorable percepción de los transgénicos, generalmente relacionados al uso de agrotóxicos.

DESARROLLOS ARGENTINOS

En decenas de laboratorios públicos argentinos se estudian los genes de distintos organismos, entre ellos las plantas. Para conocer la función desconocida de un gen, una de las estrategias experimentales es aislarlo de los otros y ponerlo en una planta como transgén. Como vimos antes, esa planta receptora pasa a ser un transgénico u OGM (organismo genéticamente modificado). Apagar o encender un gen de manera continua y analizar el efecto que tiene en el desarrollo de la planta, nos ayuda, junto con una gran variedad de experimentos de biología molecular, bioquímica y fisiología, a dilucidar el rol de ese gen. Pero, además, esta estrategia nos permite estudiar el comportamiento de esa planta y determinar si ese transgén la mejora o no en alguna característica que nos interese. Normalmente primero estudiamos la función de los genes utilizando una planta modelo que se llama *Arabidopsis*, la cual no tiene uso agronómico alguno pero presenta una serie de ventajas para llevar a cabo experimentos de laboratorio.

Cuando un científico encuentra un gen que puede mejorar el comportamiento de un cultivo sigue estando a años luz de un producto comercial. Por un lado existen grandes diferencias entre una planta de *Arabidopsis* y una de soja, maíz o trigo. El efecto en el modelo puede no traducirse en el cultivo. Con mayor influencia sobre este problema, llevar un desarrollo desde la planta modelo hasta el cultivo y pasar por todos los requerimientos de CONABIA (Comisión Nacional



PLANTAS SALVAJES

PLANTAS TRANSGÉNICAS

FIGURA 8. Al exponer las plantas de *Arabidopsis* a la falta de agua (lo que se conoce como estrés hídrico), las variedades salvajes sufren un efecto severo y mueren (macetas de la izquierda). Por el contrario, la expresión transgénica del factor de transcripción de girasol les confiere a las plantas tolerancia a la sequía, permitiéndoles sobrevivir el período de estrés (macetas de la derecha).

de Biotecnología) y SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) implica una inversión millonaria en dólares. Es por eso que sólo dos desarrollos argentinos han sido aprobados por estas agencias regulatorias y justamente lo han logrado por la asociación con empresas nacionales que han invertido en este proceso. Se trata de una papa resistente a virus y la soja tolerante a la sequía.

Su liberación comercial constituiría un hito en la historia de nuestro país ya que por primera vez se aprobarían tecnologías desarrolladas en Argentina y nacidas en laboratorios públicos. Todos los cultivos aprobados hasta ahora son desarrollos de empresas multinacionales y tienen aprobación previa en EEUU.

El trigo y la soja tolerantes a la sequía tienen agregado un gen de girasol, otra planta, que casualmente también codifica un factor de transcripción. Este cambio hace a las plantas mucho más tolerantes a la sequía, como lo es el girasol, lo cual primero se descubrió en la especie modelo *Arabidopsis* (Figura 8). En cierta medida la generación de este «híbrido» entre el trigo y una pequeña parte del girasol, es la forma moderna y eficiente de hacer lo que viene haciendo la humanidad desde hace 10.000 años, cuando se inventó la agricultura, mediante cruces entre plantas silvestres y posterior selección con fines de mejoramiento.

¿CÓMO SE APRUEBA UN CULTIVO TRANSGÉNICO Y POR QUÉ NO HAY MÁS DESARROLLOS ARGENTINOS EN EL MERCADO?

Un cultivo transgénico tiene que pasar muchas pruebas de inocuidad que no se les requiere a los demás alimentos. La CONABIA exige una gran cantidad de ensayos a campo realizados en muchas localidades diferentes y a lo largo de muchos años para determinar que el nuevo cultivo no afecta a la flora ni a la fauna. El SENASA exige por su lado una cantidad enorme de pruebas para determinar que el nuevo producto es seguro para la salud humana y animal, incluyendo costosos ensayos en animales de laboratorio alimentados exclusivamente con ese cultivo (algo muy raro en una dieta, por cierto) y estudios bioquímicos que determinen que el producto es muy similar a aquél del cuál proviene y en ninguno de sus compuestos sobrepasa o pierde los límites conocidos en otros alimentos.

Aún pasados y aprobados por estas oficinas públicas, los transgénicos no se liberan comercialmente hasta que la oficina de Mercados del ex Ministerio de Agricultura los apruebe. Esta oficina tiene como función evaluar el impacto de la nueva liberación en el mercado nacional e internacional.

Si bien hay muchos investigadores en el sector público que han descubierto genes con potencial interés para mejorar los cultivos, los costos de todos estos ensayos para obtener las aprobaciones son tan altos que resultan inabordables por el sector científico público. Lamentablemente, tampoco abundan las empresas biotecnológicas nacionales y el Estado suele estar ausente.

ÍNDICE

- 7 PRÓLOGO. ADRIÁN PAENZA
9 INTRODUCCIÓN. FEDERICO D. ARIEL

CAPÍTULO 1

- 17 **SPLICING ALTERNATIVO: EL SASTRE DE NUESTRAS CÉLULAS.** ALBERTO R. KORNBLIHTT

CAPÍTULO 2

- 25 **DESARMANDO AL VIRUS DEL DENGUE.**
ANDREA V. GAMARNIK

CAPÍTULO 3

- 39 **GENES DESREGULADOS Y CÉLULAS REBELDES: EL ESCAPE DE LOS TUMORES.**
GABRIEL A. RABINOVICH y ADA G. BLIDNER

CAPÍTULO 4

- 49 **HAY GENES EN MI ALMUERZO.** RAQUEL L. CHAN



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

ENRIQUE MAMMARELLA

Rector

LAURA TARABELLA

Decana Facultad de Humanidades y Ciencias