

WDS

Planeación de Biología molecular

Nombre de la materia: Biología molecular

Profesor: QFB. Hugo Nájera Mijangos

Licenciatura: Medicina Humana

Semestre: Cuarto semestre

marco estratégico de referencia

antecedentes históricos

nuestra universidad tiene sus antecedentes de formación en el año de 1979 con el inicio de actividades de la normal de educadoras “Edgar robledo Santiago”, que en su momento marcó un nuevo rumbo para la educación de Comitán y del estado de Chiapas. nuestra escuela fue fundada por el profesor de primaria Manuel albores Salazar con la idea de traer educación a Comitán, ya que esto representaba una forma de apoyar a muchas familias de la región para que siguieran estudiando.

en el año 1984 inicia actividades el cbtis Moctezuma Ilhuicamina, que fue el primer bachillerato tecnológico particular del estado de Chiapas, manteniendo con esto la visión en grande de traer educación a nuestro municipio, esta institución fue creada para que la gente que trabajaba por la mañana tuviera la opción de estudiar por las tardes.

la maestra Martha Ruth alcázar mellanes es la madre de los tres integrantes de la familia albores alcázar que se fueron integrando poco a poco a la escuela formada por su padre, el profesor Manuel albores Salazar; Víctor Manuel albores alcázar en septiembre de 1996 como chofer de transporte escolar, Karla Fabiola albores alcázar se integró como profesora en 1998, Martha Patricia albores alcázar en el departamento de finanzas en 1999.

en el año 2002, Víctor Manuel albores alcázar formó el grupo educativo albores alcázar s.c. para darle un nuevo rumbo y sentido empresarial al negocio familiar y en el año 2004 funda la universidad del sureste.

la formación de nuestra universidad se da principalmente porque en Comitán y en toda la región no existía una verdadera oferta educativa, por lo que se veía urgente la creación de una institución de educación superior, pero que estuviera a la altura de las exigencias de los jóvenes que tenían intención de seguir estudiando o de los profesionistas para seguir preparándose a través de estudios de posgrado.

nuestra universidad inició sus actividades el 18 de agosto del 2004 en las instalaciones de la 4ª avenida oriente sur no. 24, con la licenciatura en puericultura, contando con dos grupos de cuarenta alumnos

cada uno. en el año 2005 nos trasladamos a nuestras propias instalaciones en la carretera Comitán – Tzimol km. 57 donde actualmente se encuentra el campus Comitán y el corporativo Uds., este último, es el encargado de estandarizar y controlar todos los procesos operativos y educativos de los diferentes campus, sedes y centros de enlace educativo, así como de crear los diferentes planes estratégicos de expansión de la marca a nivel nacional e internacional.

nuestra universidad inició sus actividades el 18 de agosto del 2004 en las instalaciones de la 4ª avenida oriente sur no. 24, con la licenciatura en puericultura, contando con dos grupos de cuarenta alumnos cada uno. en el año 2005 nos trasladamos a nuestras propias instalaciones en la carretera Comitán – Tzimol km. 57 donde actualmente se encuentra el campus Comitán y el corporativo Uds., este último, es el encargado de estandarizar y controlar todos los procesos operativos y educativos de los diferentes campus, así como de crear los diferentes planes estratégicos de expansión de la marca.

misión

formar a médicos con capacidades resolutivas de índole humana, ambiental, social y ética, con base en criterios de calidad y excelencia establecidos tanto en su proceso de enseñanza como en sus programas académicos, con amplio espíritu de servicio y con necesidad de actualización continua de sus conocimientos.

visión

ser una de las mejores instituciones de educación en salud en la región y en cada uno de los lugares donde se poseione, reconocida por sus procesos de calidad y gestión contribuyendo en la asistencia, docencia e investigación a favor de la sociedad.

valores

- ética
- humanismo
- justicia
- autonomía
- profesionalismo

escudo



el escudo de la Uds., está constituido por tres líneas curvas que nacen de izquierda a derecha formando los escalones al éxito. en la parte superior está situado un cuadro motivo de la abstracción de la forma de un libro abierto.

eslogan

“mi universidad” pasión por educar

albores



es nuestra mascota, un jaguar. su piel es negra y se distingue por ser líder, trabaja en equipo y obtiene lo que desea. el ímpetu, extremo valor y fortaleza son los rasgos que distinguen.

Nombre: Biología molecular

Objetivo: Se proporcionara conocimientos actualizados de la biología molecular y de su aplicación en biomedicina, se estudiaran las bases moleculares de los procesos celulares relacionados con la transmisión de la información genética así como sus mecanismos de regulación.

PLANEACIONES PERIODO AGOSTO-ENERO 2024 BIOLOGIA MOLECULAR

ÍNDICE

TEMAS Y SUBTEMAS

Unidad 1

1. Genoma humano y biología molecular básica de la célula
 - 1.1 antecedentes históricos y descubrimientos más relevantes
 - 1.2 el genoma humano
 - 1.3 mecanismos de perpetuación de la información genética

Unidad 2

- 1.4 Replicación génica
- 1.5 Transcripción y procesamiento de la información genética
- 1.6 Transcripción procariota
- 1.7 Transcripción eucariota

Unidad 3

- 1.8 Síntesis de proteínas
- 1.9 Degradación de proteínas
- 2.0 Bases moleculares de la apoptosis
- 3.0 Técnicas de biología molecular

Unidad 4

- 4.0 terapia Génica
 - 4.1 terapia génica en enfermedades neurodegenerativas
 - 4.2 Biología molecular del cáncer

1.0 Genoma humano y biología molecular básica de la célula

El genoma humano se terminó de descifrar en el año 2003, después de un trabajo en conjunto de más de 10 años. El ADN humano contiene alrededor de 25,000 genes distintos y cada uno de éstos cuenta con la información necesaria para la síntesis de proteínas. De esta forma, los rasgos se heredan a través de los genes. El ADN se enreda y se acumula en unas estructuras con forma de bastones llamados cromosomas.

Todos los seres humanos tienen 23 pares de cromosomas, es decir, 46 en total. Cuando un espermatozoide y un óvulo se unen, aportan 23 cromosomas del padre y 23 cromosomas de la madre. Entonces, generan un nuevo ser con 46 cromosomas.

En resumen, la vida en este planeta es muy diversa debido a que hay una grandísima cantidad de combinaciones genéticas.

Concepto de gen y de genoma.

El diccionario de la real Academia Española (vigésima primera edición impreso en abril de 1997) define el gen como cada una de las partículas dispuestas en él, un orden fijo a lo largo de los cromosomas (Cada uno de ciertos corpúsculos, casi siempre en forma de filamentos, que existen en el núcleo de las células y solamente son visibles durante la mitosis) y que determinan la aparición de los caracteres hereditarios en los virus, las bacterias, las plantas y los animales.

En cuanto respecta al genoma, el Diccionario ya citado define como el conjunto de los cromosomas de una célula. Según Benjamín Lewin (“Genes VII.- MARBAN LIBROS, S. L.- Traducción al español a cargo de la Dra... Rodríguez Da pena y otros. Madrid España. 2001) La naturaleza básica del gen fue definida por Mendel hace ya más de un siglo.

Resumido en dos de sus leyes, el gen fue identificado como un “factor articulado” que se transmite sin modificaciones de los padres a su descendencia.

Las leyes de Mendel predicen que los genes localizados en distintos cromosomas seguirán una transmisión independiente. Sin embargo genes localizados en el mismo cromosoma muestran una herencia asociada: prueba básica de ello es que los genes de distintos cromosomas se recombinan al azar de una generación a otra, mientras que los genes que

están asociados muestran menos recombinaciones, es decir, tienden a permanecer ligados.

Este autor dice que los estudios genéticos han permitido construir un mapa de conexiones que enlaza todos los genes portados por un cromosoma. El mapa genético de un grupo de ligamiento se corresponde con su existencia física en el cromosoma. En los mapas genéticos de los organismos superiores que se establecieron durante la primera mitad del siglo veinte, los genes se disponían como las cuentas de un collar; se presentaban en un orden establecido, y la recombinación genética suponía la transferencia de las porciones correspondientes del collar entre cromosomas homólogos. A efectos prácticos, el gen es un objeto misterioso (la cuenta) cuya relación con su entorno (el collar).

GEN: es la unidad básica de herencia de los seres vivos, un gen es una secuencia lineal de nucleótidos en las moléculas de ADN

Un gen es considerado como la unidad de almacenamiento de información y están dispuestos a lo largo de cada uno de los cromosomas

Genoma: cuerpo colectivo de información genética presente en una especie

Cromosoma: son pequeños bastoncillos en los cuales está organizada la cromatina del núcleo celular durante las diversas divisiones celulares.

Cromatina: complejo formado por DNA y proteínas que se encuentra en el núcleo celular y da estabilidad a los cromosomas

Cariotipo: conjunto de cromosomas de una célula en mitosis los cuales se encuentran ordenados y clasificados

Genotipo: se le denomina genotipo a la composición genética de una persona

Fenotipo: manifestación física de un rasgo distintivo

1.1 antecedentes históricos y descubrimientos más relevantes

CRONOLOGÍA DE LA BIOLOGÍA

- 1750 a.C. Los sumerios fabrican la cerveza.
- 1000 a.C. Los babilonios celebran con ritos religiosos la polinización de las palmeras.
- 323 a.C. Aristóteles especula sobre la naturaleza de la reproducción y la herencia.
- 100-300 Se escriben en la India textos metafóricos sobre la naturaleza de la reproducción humana.
- 1590 Se inventa el microscopio.
- 1663 Robert Hooke describe por primera vez a la célula.
- 1676 Se confirma la reproducción sexual en las plantas.
- 1677 Se contempla el espermatozoide animal a través del microscopio.
- 1802 Aparece por primera vez referida la palabra biología.
- 1830 Se descubren las proteínas.
- 1833 Se aísla la primera enzima.
- 1838 Se descubre que todos los organismos vivos están compuestos por células.
- 1859 Charles Darwin hace pública su teoría sobre la evolución de las especies.
- 1866 Gregor Mendel describe, en los guisantes, las unidades fundamentales de la herencia (que posteriormente recibirán el nombre de genes).
- 1871 Se aísla el DNA en el núcleo de una célula.
- 1883 Francis Galton acuña el término eugenesia.
- 1887 Se descubre que las células reproductivas constituyen un linaje continuo, diferente de las otras células del cuerpo.
- 1908 Se establecen modelos matemáticos de las frecuencias génicas en poblaciones mendelianas.
- 1909 Las unidades fundamentales de la herencia biológica reciben el nombre de genes.

- 1925 Se descubre que la actividad del gen está relacionada con su posición en el cromosoma.
- 1927 Se descubre que los rayos X causan mutaciones genéticas.
- 1943 Se identifica el DNA como la molécula genética.
- 1940-1950 Se descubre que cada gen codifica una única proteína.
- 1953 Se propone la estructura en doble hélice del DNA.
- 1956 Se identificó 23 pares de cromosomas en las células del cuerpo humano.
- 1966 Se descifra el código genético completo del DNA.
- 1972 Se sintetiza la primera molécula de DNA recombinante en el laboratorio.
- 1973 Tienen lugar los primeros experimentos de ingeniería genética, en los que genes de una especie se introducen en organismos de otra especie y funcionan correctamente.
- 1975 La conferencia de Asilomar evalúa los riesgos biológicos de las tecnologías de DNA recombinante, y aprueba una moratoria de los experimentos con estas tecnologías.
- 1975 Se obtienen por primera vez los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales.
- 1976 Se funda en Estados Unidos Genentech, la primera empresa de ingeniería genética.
- 1977 Mediante técnicas de ingeniería genética, se fabrica con éxito una hormona humana en una bacteria.
- 1977 Se desarrollan las primeras técnicas para secuenciar con rapidez los mensajes químicos de las moléculas del DNA.
- 1978 Se clona el gen de la insulina humana.
- 1980 El Tribunal Supremo de Estados Unidos dictamina que se pueden patentar los microbios obtenidos mediante ingeniería genética.
- 1981 El primer diagnóstico prenatal de una enfermedad humana por medio del análisis del DNA.

- 1982 Se genera el primer ratón transgénico (“superratón”), al insertar el gen de la hormona del crecimiento de la rata en óvulos de ratón hembra fecundados.
- 1982 Se produce insulina humana mediante técnicas de DNA recombinante.
- 1983 Se desarrolla la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, que permite replicar (copiar) genes específicos con gran rapidez.
- 1984 Producción de las primeras plantas transgénicas.
- 1985 Se inicia el uso de interferones en el tratamiento de enfermedades víricas.
- 1985 Se utiliza por primera vez la “huella genética” en una investigación judicial en Gran Bretaña. • 1986 Se autorizan las pruebas clínicas de la vacuna contra la hepatitis B obtenida mediante ingeniería genética.
- 1987 Propuesta comercial para establecer la secuencia completa del genoma humano (proyecto Genoma), compuesto aproximadamente por 100 000 genes.
- 1987 Comercialización del primer anticuerpo monoclonal de uso terapéutico.
- 1988 Primera patente de un ser vivo producido mediante ingeniería genética.
- 1989 Comercialización de las primeras máquinas automáticas de secuenciación del DNA.
- 1990 Primer tratamiento con éxito mediante terapia génica en niños con trastornos inmunitarios (“niños burbuja”). Se ponen en marcha numerosos procedimientos experimentales de terapia génica para intentar curar enfermedades cancerosas y metabólicas.
- 1994 Se comercializa en California el primer vegetal modificado genéticamente (un tomate) y se autoriza en Holanda la reproducción del primer toro transgénico.
- 1995 Se completan las primeras secuencias de genomas de seres vivos: se trata de las bacterias *Haemophilus influenzae* y *Mycoplasma genitalium*.
- 1997 Clonación del primer mamífero, una oveja llamada “Dolly”.
- 1999 Se completa la secuenciación del genoma (175 Mb) de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta).

- 2000 Se termina la primera versión del genoma humano (3 200 Mb) y se completa la secuencia de Arabidopsis thaliana (157 Mb).
- 2002 Presentación del genoma humano por Celera Genomics y el grupo de colaboradores de laboratorios financiados por fundaciones públicas.
- 2007 Primer “trasplante” de un genoma completo de una bacteria a otra. Se publica como “transmutación de una especie biológica en otra” en Science el 28 de junio de 2007

1.2 el genoma humano

El genoma humano no es más que toda la información genética presente en un solo grupo de los cromosomas humanos que incluye los 22 autosomas y los cromosomas sexuales X ,y Y.

El ser humano tiene aproximadamente 25,000 genes los cuales están destinados a dar características específicas de acuerdo a la composición de sus bases nitrogenadas.

En 1990 se puso en marcha el Proyecto Genoma Humano (HGP, por sus siglas en inglés) con el objetivo de descifrar la gran mayoría del genoma humano. Esto significa también descubrir todos los genes humanos y localizarlos a lo largo del genoma, así como comprender la cantidad de ADN codificante que tenemos, adquiriendo conocimientos sobre el desarrollo, la fisiología, la medicina y la evolución humana. En última instancia, el objetivo era avanzar en la investigación biomédica descifrando información importante sobre el funcionamiento del material genético.

Para lograr este objetivo se formó el Consorcio Internacional para la Secuenciación del Genoma Humano, un grupo de colaboración abierto en el que participan veinte centros de seis países para secuenciar el ADN humano. En el consorcio participaron cientos de científicos de 20 centros de secuenciación de Alemania, China, Estados Unidos, Francia, Gran Bretaña y Japón. Cabe mencionar que entre los participantes en este proyecto se encontraba nuestro director técnico, Vincenzo Cirigliano, que participó en la secuenciación de un fragmento del cromosoma X.

Podemos pensar que este proyecto consistió en secuenciar el ADN de un solo individuo, sin embargo, este proyecto se llevó a cabo con la participación de numerosos voluntarios cuya identidad se mantiene en secreto. Los candidatos fueron elegidos entre una población diversa que proporcionó diversas muestras de sangre. No se utilizaron todas las muestras solicitadas, por lo que ni siquiera los voluntarios saben si su ADN se utilizó finalmente para este proyecto o no.

El Proyecto Genoma Humano comenzó en 1990 en Estados Unidos, con el objetivo oficial de cartografiar la secuencia completa del ADN de los seres humanos.

Considerado, con razón, una de las grandes hazañas de la investigación en la historia, este análisis del genoma humano se completó en abril de 2003. Trazar el mapa de todos los genes encontrados supuso un gran reto, lo que llevó a destinar grandes sumas de dinero a la finalización del proyecto. Inicialmente, la financiación comenzó con unos 3.000 millones de dólares y una estimación de finalización en 15 años. Sin embargo, el proyecto se completó 2 años antes y con un presupuesto global inferior.

El primer borrador del genoma humano se publicó en el 2000, habiéndose secuenciado aproximadamente el 85% del genoma. En 2003, cuando se publicaron los resultados finales, se reveló que el genoma contenía aproximadamente 3.000 millones de pares de bases y que el número total de genes del organismo humano era de 20.000... ¡sorprendente si lo comparamos con el hecho de que animales pequeños como las ratas tienen 30.000 genes! Por lo tanto, la conclusión es que la complejidad del organismo no está directamente relacionada con el número de genes que posee.

Además, los científicos del proyecto descubrieron que el porcentaje de ADN que codifica para proteínas se sitúa en torno al 1,5%. Esto lleva a preguntarse qué hace el 98,5% restante, denominado ADN no codificante. Algunas investigaciones demuestran que parte de este ADN no codificante interviene en la regulación de los genes, pero probablemente haya muchas otras funciones del ADN no codificante que aún desconocemos y sobre las que se están realizando más estudios.

Tecnología del Proyecto Genoma Humano: ¿Cómo funcionó?

A mediados de la década de 1970 se desarrollaron en paralelo dos métodos de secuenciación: el de base química de Maxam y Gilbert y el de base enzimática o «método de terminación de la cadena» de Sanger y Coulson. Ambos métodos consiguen determinar el orden de los nucleótidos de un fragmento de ADN. Finalmente, fue el método enzimático el que se impuso y, de hecho, con algunas mejoras, se sigue utilizando en la actualidad.

El método de terminación de la cadena se basa en sintetizar secuencialmente una cadena complementaria de ADN utilizando nucleótidos fluorescentes especiales que detienen la síntesis. De esta forma, se obtienen fragmentos de diferentes tamaños con el último nucleótido marcado con fluorescencia, lo que permite establecer la secuencia de ADN con la información proporcionada por todos los fragmentos de diferente tamaño.

Para el HGP, esta tecnología de secuenciación se adaptó para que fuera capaz de gestionar una enorme cantidad de material de ADN. La estrategia utilizada se denominó *hierarchical shotgun sequencing*, que implicaba muchos pasos independientes. En primer lugar, se clonaron grandes fragmentos del genoma humano utilizando la metodología de los cromosomas artificiales bacterianos (BAC). El ADN humano se fragmentó en trozos de unos 150.000-200.000 pares de bases cada uno. A continuación, estos fragmentos de ADN se insertaron en BACs y se clonaron en células bacterianas que replican los fragmentos de ADN humano, para obtener una cantidad suficiente para la secuenciación. Una vez replicado el ADN, las secuencias de ADN se dividieron aleatoriamente en fragmentos más pequeños para secuenciarlos mediante el método automatizado de Sanger.

No sólo las técnicas eran importantes, también se invirtió mucho esfuerzo en desarrollar programas informáticos específicos que permitieran analizar los datos secuenciados.

En total, la primera secuenciación completa del genoma humano llevó más de 10 años y costó mucho dinero en financiación. Al final del proyecto, los investigadores no se detuvieron: siguieron mejorando las técnicas utilizadas dentro del proyecto, lo que finalmente dio lugar a la Secuenciación de Nueva Generación (NGS, por sus siglas en inglés).

Así es como ahora podemos secuenciar el genoma de una persona en poco tiempo, ¡y a un coste asequible!

El Proyecto Genoma Humano y más allá

Cuando se inició el Proyecto Genoma Humano, el objetivo principal era establecer la secuencia del genoma humano. Gracias al inmenso trabajo realizado en este proyecto, los científicos consiguieron descubrir el «libro de instrucciones de la vida». Este logro supuso una enorme mejora en el conocimiento de la biología humana y fue un gran paso para nuevos estudios genéticos. Se han cartografiado muchos genes relacionados con enfermedades hereditarias, lo que ha abierto el camino al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamientos, así como a investigaciones para establecer los mecanismos genéticos implicados en determinadas enfermedades.

Ahora se dispone de nuevas tecnologías de secuenciación, que permiten una secuenciación más rápida y asequible. Esto abre la posibilidad de acceder a una medicina personalizada; nos permite saber si tenemos un mayor riesgo de desarrollar ciertas enfermedades, que también pueden afectar a nuestra descendencia. También nos ayuda a entender cómo podemos reaccionar a determinados fármacos y mucha más información codificada en nuestro libro de la vida. Esto está cambiando el concepto de atención médica, proporcionando herramientas para prevenir enfermedades en individuos sanos sin ningún síntoma de enfermedad. Actualmente, esta revolución genómica está mejorando los chequeos médicos y, en última instancia, los posibles tratamientos.

En Veritas, ofrecemos [myGenome](#), el servicio de secuenciación del genoma completo y su interpretación destinado a ayudar a prevenir enfermedades y mejorar su salud. La prueba proporciona información genética clave al paciente y a su médico para adaptar el estilo de vida y la atención médica del individuo. myGenome es la prueba genética preventiva más completa para pacientes sanos. No dude en ponerse en contacto con nosotros para obtener más detalles.

I.3 mecanismos de perpetuación de la información genética

Los mecanismos de protección del DNA son aquellos que van a ayudar a la molécula a cumplir sus funciones sin que esté presente algún daño durante estos procesos.

Las histonas son las proteínas mayormente asociado al DNA específicamente de las células eucariontes

En condiciones normales las células eucariontes contienen 5 histonas abundantes como son la H1, H2A,H2B,H3 Y H4.

Estas histonas H2A,H2B,H3 Y H4 tiene la capacidad de formar el núcleo de proteínas alrededor del cual se va enrollar la molécula de ADN nucleosómico

La histona H1 no es parte de la partícula nucleosómica central

Las otras 4 histonas se encuentran en iguales cantidades en las células mientras que la H1 solo exhibe solo la mitad de abundancia que las otras histonas.

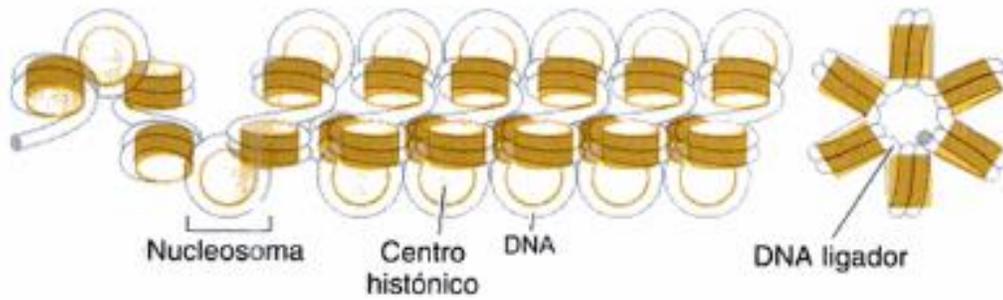
Solo una molécula de H1 se asocia con cada nucleosoma

El armado del nucleosoma comprende la asociación ordenada de subunidades proteicas de histonas con el DNA.

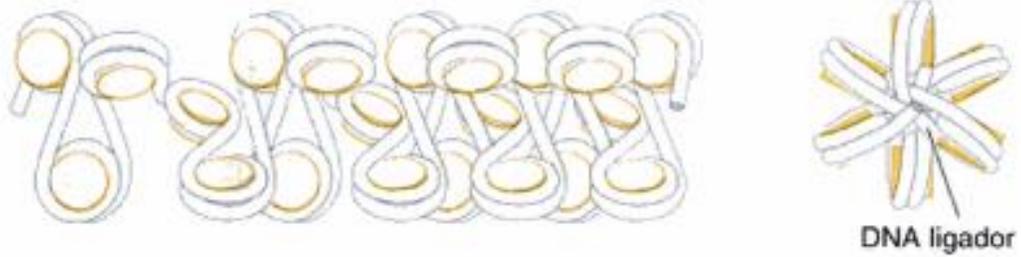
Primero el tetramero H3 Y H4 se une al DNA

Posteriormente los dos dímeros formados por H2A y H2B se unen al complejo H3YH4-DNA para que se logre formar el nucleosoma definitivo.

a Solenoide



b Zigzag



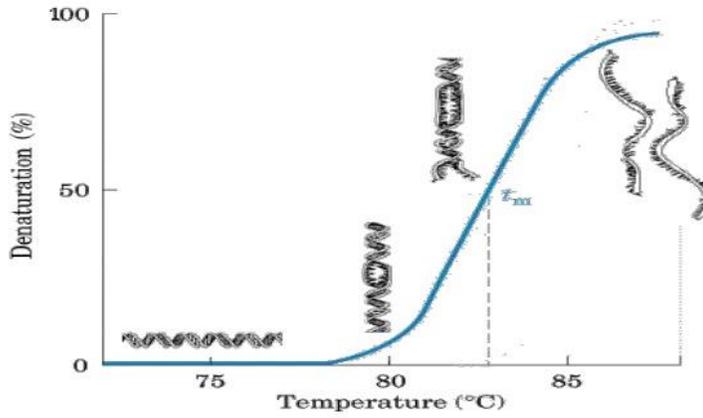
Desnaturalización

Esta forma de protección del DNA puede darse por alteración en sus condiciones por ejemplo

- Aumento de la temperatura
- Cambio en el pH
- Cambio en las condiciones físicas del DNA

Este puede ser un proceso controlado o bien puede darse por una acción ocasionada por alguna noxa.

Relación de la desnaturalización del ADN con la temperatura °C

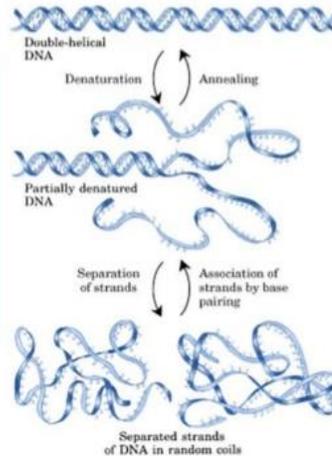


Renaturalización

Proceso en el cual el ADN recupera su forma de doble hélice mediante el descenso de la temperatura hasta un punto donde encuentra su equilibrio.



La renaturalización es un fenómeno de unión al azar, y por tanto la molécula de DNA renaturalizada no contiene las hebras originales



1.4 Replicación Génica

La preservación de las especies sobre el planeta implica la necesidad de la reproducción de las diferentes formas de vida. Cada especie tiene características únicas, que en su mayoría son el resultado de la expresión de su carga genética.

Desde este punto de vista, uno de los procesos biológicos celulares más relevante es la replicación del DNA, molécula que guarda en su secuencia de bases la información genética que distingue a los individuos como integrantes de una especie en particular.

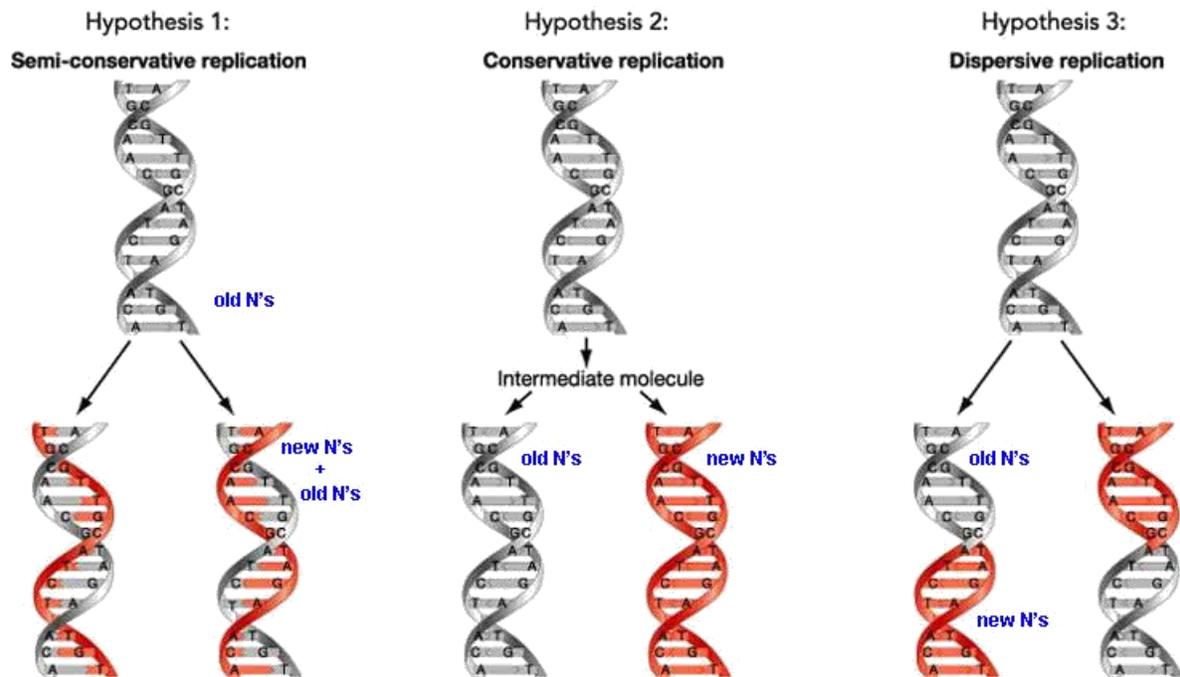
El DNA está formando por dos hilos de nucleótidos enrollados uno sobre el otro, formando una hélice doble guardada en la profundidad de las células. En cada ciclo celular, las hebras de la molécula de DNA se separan y se copian con la más alta fidelidad, para luego volver a reformar la doble hélice, en una danza eterna que mantiene vigente la vida hasta nuestros días

El DNA es una hebra doble de nucleótidos con una secuencia determinada, que no tiene señales adicionales que diferencien las funciones de una secuencia en particular. Se sabe que en esas hileras de nucleótidos están ubicados los genes, y que cada uno de ellos proporciona información para construir organismos, pero no hay señales que muestren dónde inicia y

dónde termina determinado gen; del mismo modo, sabemos que, además de genes, el DNA también contiene secuencias específicas que no generan productos génicos, pero que son primordiales para que los genes puedan regularse de manera adecuada.

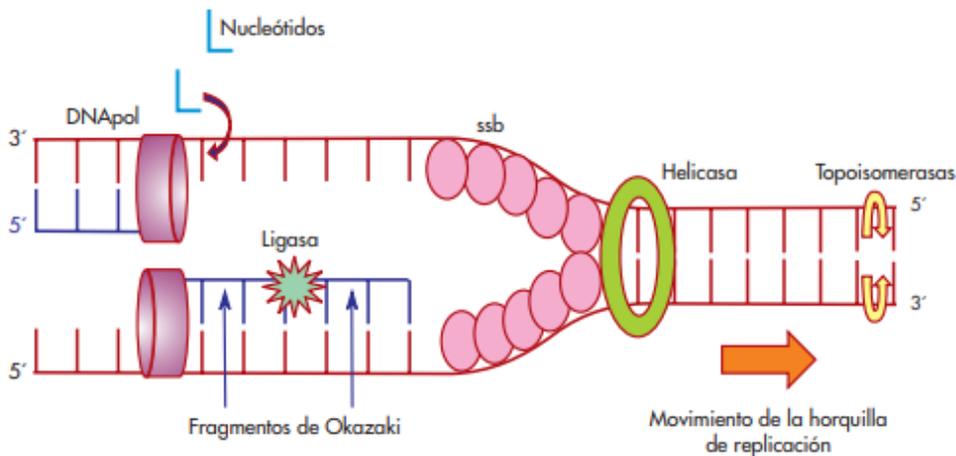
Entre otras secuencias de esta naturaleza, está el llamado origen de replicación, que es el sitio donde debe iniciar la copia del material genético, en cada ciclo celular. En los organismos procariontes, cuyos genomas son relativamente sencillos, hay un solo origen de replicación, en tanto que en los eucariontes, con genomas más amplios y complejos, se encuentran varios orígenes de replicación.

Según algunos autores, existen 330 orígenes en el genoma de 14 Mb de la levadura común, y probablemente más de 10 000 en los metazoarios. En las bacterias, cuyo organismo modelo es la enterobacteria *Escherichia coli*, el sitio de origen se denomina OriC, y está formado por módulos cortos de secuencia repetida, con una gran cantidad de nucleótidos de adenina y timina dispuestos en cuatro módulos con la secuencia 5'-TGTGGATAA-3' y tres módulos con la secuencia 5'-GATCTNTTTATTT-3'.



- Semiconservativa: una cadena sirve de molde para una nueva cadena

- El experimento de M. Meselson y F. Stahl (1958) demuestra que la replicación es semiconservativa



MECANISMO INTEGRAL DE REPLICACIÓN Para su estudio, el proceso de replicación puede dividirse en etapas, cada una de las cuales incluye diferentes enzimas de la maquinaria de replicación.

- Etapa 1. Reconocimiento del origen de replicación: la replicación inicia en sitios específicos dentro del genoma, llamados orígenes de replicación. Éstos son reconocidos por helicasas específicas mediante una reacción en la que se utiliza ATP. Los sitios de origen de replicación tienen la característica de ser módulos cortos de secuencia repetida, con abundancia de adeninas y timinas. Una vez que las helicasas reconocen el origen, producen la abertura de ese segmento. A partir de ahí, otras helicasas con estructura de anillo se encargarán de inducir la abertura del resto de la cadena, translocándose a través de ella, de modo bidireccional a partir del origen de replicación.
- Etapa 2. Mantenimiento de la abertura de la hélice: una vez que la hélice de DNA se ha separado en el sitio de origen, las pequeñas proteínas ssb se asocian con los nucleótidos de

cada hebra, impidiendo que se regeneren los puentes de hidrógeno entre ellos. De esta manera permanecen separadas las hebras para dar cabida al resto de enzimas participantes.

- Etapa 3. Síntesis del cebador: una vez separada la hebra de DNA en el sitio de inicio, una primasa sintetiza un segmento corto de RNA, que servirá como cebador para la siguiente enzima.

- Etapa 4. Inicio de la copia: el extremo 3' del cebador funciona como punto de anclaje para la polimerasa de DNA, que se ensambla secuencialmente: primero la subunidad β , con la participación del complejo γ , y después el centro enzimático. Una vez ensamblada la enzima completa, el centro enzimático añade nucleótidos complementarios a la cadena que está copiando. Según se propone, la polimerasa III forma un dímero, con uno de sus monómeros ensamblado sobre la cadena líder (la que tiene la orientación 5'→ 3') y el otro ensamblado sobre la cadena acompañante (con orientación 3'→ 5'). Dada la capacidad de polimerización 5'→ 3' de la polimerasa, la cadena líder se copia en un proceso continuo, en tanto que la acompañante se copia en un proceso discontinuo que genera fragmentos pequeños de hebra nueva, que en un primer momento están separados unos de otros. Estos segmentos, denominados fragmentos de Okazaki, se unen mediante la acción posterior de una ligasa.

- Etapa 5. Relajación de superenrollamientos: por delante de la maquinaria de replicación, y como resultado del avance de la misma por el dúplex de DNA, se generan superenrollamientos en la hebra, que si no son relajados en un momento dado interrumpirán el paso de la maquinaria de replicación. Las topoisomerasas son las enzimas encargadas de relajar estos superenrollamientos, asegurando el paso libre de la maquinaria de replicación en toda la longitud de la cadena de DNA.

- Etapa 6. Terminación de la replicación: de la misma forma que existen sitios específicos de inicio de replicación, se han descrito sitios de terminación del proceso, que también tienen la característica de ser secuencias cortas repetidas, además de presentar una disposición encontrada. Se sabe que hay ciertas proteínas denominadas RTP (replication terminator protein) cuya función es inhibir el desplazamiento de las helicasas, y que están incluidas con la disociación de estas enzimas en los sitios de terminación de la replicación.

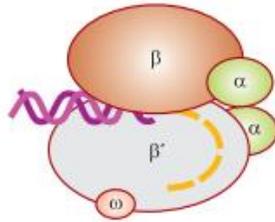
I.5 transcripción y procesamiento de la información génica

Definición de conceptos La iniciación de la transcripción es crucial para determinar qué genes se pueden expresar, cuándo y dónde. Es importante descifrar la iniciación de la transcripción por todas las polimerasas de RNA a través de la identificación del sitio de inicio para la transcripción.

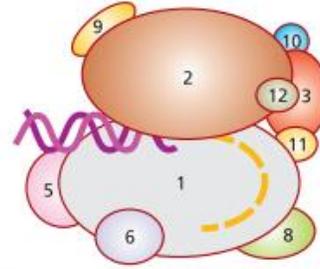
En eucariontes, la regulación del inicio de la transcripción ocurre a diferentes niveles: Nivel promotor Nivel estimulador Nivel de la dinámica del nucleosoma Nivel de condensación del cromosoma Los primeros dos niveles son utilizados por los procariontes. Promotor son señales del DNA que le indican al aparato de transcripción cómo debe iniciar una transcripción en un sitio específico cerca del promotor.

La actividad del promotor puede ser regulada por la unión de factores auxiliares en sitios disponibles y éstos a su vez se determinan por el posicionamiento del nucleosoma dependiente de la restructuración de la cromatina. La condensación de esta última inhibe la transcripción. La frecuencia del inicio transcripcional en un promotor determinado depende de la eficiencia con la cual éste se une y organiza el complejo de iniciación transcripcional.

Los promotores con frecuente iniciación se llaman fuertes. Los promotores débiles rara vez dirigen la iniciación transcripcional. Todos los organismos tienen una proteína que abarca o une directamente la polimerasa de RNA tipo I al DNA. En procariontes es el factor σ (sigma). En eucariontes, hay diferentes complejos de factores transcripcionales que son los encargados para el posicionamiento de las polimerasas de RNA I, II y III



• **Figura 4-1** Estructura molecular de la polimerasa de RNA (*Thermus aquaticus*) en procariontes.



• **Figura 4-2** Estructura molecular de la polimerasa de RNA tipo II de eucariontes.

I.6 transcripción eucariota y procariota

Iniciación

El mecanismo de transcripción inicia cuando la polimerasa de RNA se une a la cadena molde de DNA y reconoce la primera base para copiarse. Según las reglas de apareamiento de bases, la presencia de guanina en este sitio produce que dicha polimerasa seleccione un CTP de la mezcla de los cuatro diferentes tipos de nucleótidos de trifosfato existentes.

En tal polimerasa se produce un cambio conformacional, el cual permite la lectura de la siguiente base expuesta sobre la cadena molde del DNA, la cual es una adenina; así, la presencia de adenina en esta segunda posición induce a que la enzima seleccione a un UTP y la formación de un enlace fosfodiéster en el carbón de la posición 3'-terminal del primer nucleótido.

Esta reacción permite eliminar un pirofosfato del UTP con liberación de grandes cantidades de energía necesarias para la formación del enlace fosfodiéster. El complejo de transcripción del que forma parte la polimerasa de RNA necesita factores de iniciación que se unen a secuencias específicas del DNA para reconocer el sitio donde la transcripción ha de iniciar y se sintetice el nuevo RNA.

Las secuencias de DNA en las que se ensamblan los complejos de transcripción se llaman promotores. Los promotores tienen secuencias de nucleótidos definidas, donde las más

conocidas son la caja TATAAT y la caja TTGACA. Los promotores se localizan en los extremos 5'-terminales de los genes, es decir, por lo general en posiciones antes de iniciar la transcripción. La polimerasa de RNA se une a las secuencias promotoras que incluyen la caja TATAAT y TTGACA . La secuencia promotora está formada por unos 70 pares de bases (pb) nitrogenadas, que concuerda con el tamaño de la holoenzima polimerasa de RNA que es una esfera de unos 20 nm de diámetro.

Es común ver en células procariontes la participación de una serie de proteínas llamadas factores σ que tienen como función guiar a la polimerasa de RNA al promotor conveniente. La polimerasa de RNA se une a una de las caras del DNA bicatenario y éste se enrolla en la enzima de forma similar a como lo hace con el nucleosoma.

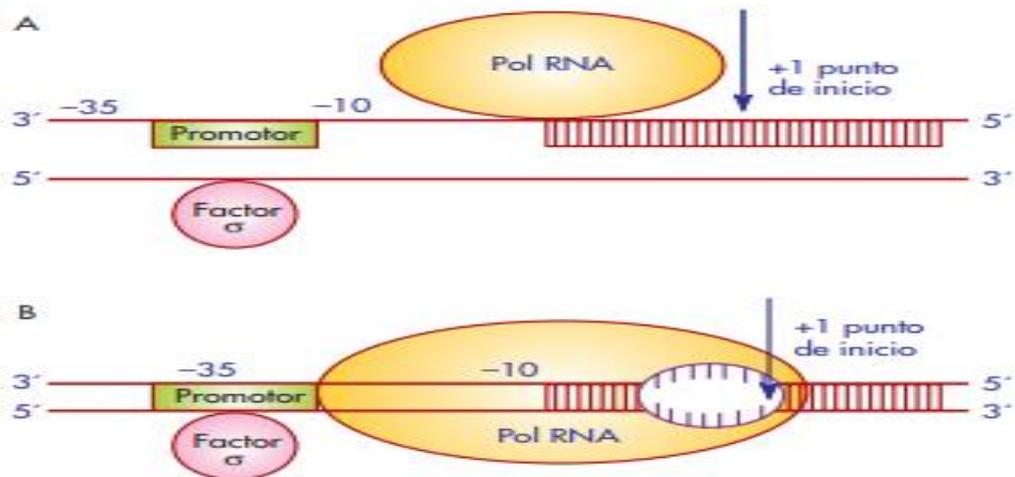
La interacción entre la polimerasa de RNA y el DNA se estabiliza por varios tipos de enlaces débiles como interacciones iónicas, interacciones de van der Waals y enlaces de hidrógeno. La unión de polimerasas de RNA a DNA se llama complejo cerrado.

El reconocimiento del promotor por la polimerasa de RNA corre a cargo de la subunidad σ . Aunque la búsqueda del promotor por esta polimerasa es muy rápida, la formación de la burbuja de transcripción o abertura del DNA y la síntesis del RNA es muy lenta. La burbuja de transcripción es una abertura de DNA desnaturalizado de 18 pares de bases, donde empieza a sintetizarse el RNA a partir del nucleótido número 10 del molde de DNA en la burbuja de transcripción .

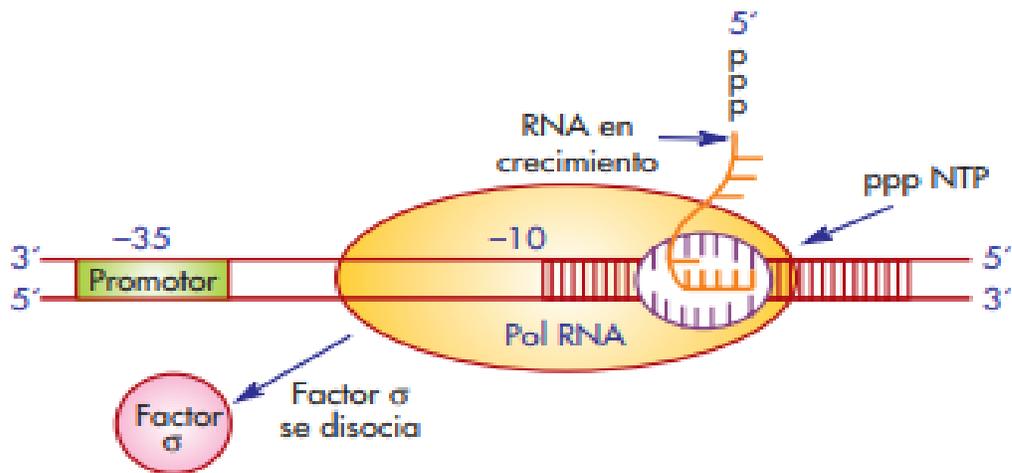
La burbuja de transcripción se llama complejo abierto. Los ribonucleótidos de trifosfato se van uniendo al molde del DNA para formar el RNA. La subunidad σ abandona el complejo de transcripción cuando el RNA alcanza una longitud de 10 ribonucleótidos. Crecimiento La polimerasa de RNA cataliza el crecimiento de la cadena del RNA. Una cadena de RNA se une por apareamiento de bases a la cadena de DNA, y para que se formen correctamente los enlaces de hidrógeno que determina el siguiente nucleótido del molde de DNA, el centro activo de esta polimerasa reconoce a los ribonucleótidos trifosfato entrantes.

Cuando el nucleótido entrante forma los enlaces de hidrógeno idóneos, entonces la polimerasa cataliza la formación del enlace fosfodiéster que corresponde. A esto se le llama crecimiento, la segunda etapa de la transcripción del RNA . Terminación Al finalizar la síntesis de RNA, esta molécula ya se ha separado por completo del DNA (que recupera su forma original) y también de la polimerasa de RNA terminando la transcripción.

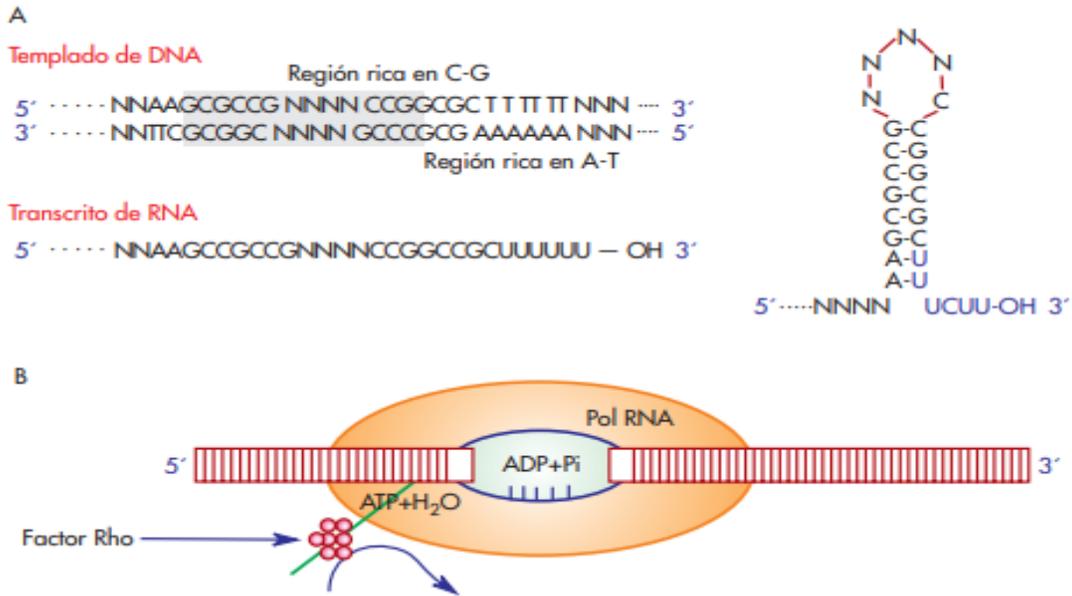
La terminación es otra etapa distinta de esta última, porque justo cuando el complejo de transcripción se ha ensamblado activamente, debe desensamblarse una vez que el crecimiento se ha completado. La terminación está señalizada por la información contenida en sitios de la secuencia del DNA que se está transcribiendo, por lo que la polimerasa de RNA se detiene al transcribir algunas secuencias especiales del DNA. Estas secuencias son ricas en guanina y citosina, situadas en el extremo 3' de los genes, seguidas de secuencias ricas en timina, formando secuencias palindrómicas, que cuando se transcriben en el RNA recién sintetizado, adoptan una estructura en horquilla que desestabiliza el complejo RNA-DNA, obligando a separarse de la polimerasa de RNA, renaturalizándose la burbuja de transcripción . Algunas secuencias de DNA carecen de la secuencia de terminación; poseen otra secuencia a la que se une una serie de proteínas reguladoras específicas para la terminación de la transcripción, como es la proteína ρ (rho), que constituye un segundo mecanismo de terminación en algunos genes en células procariontes.



• **Figura 4-3** Complejo de iniciación. A, unión de la holoenzima a la región promotora (complejo cerrado). B, separación de la doble hebra (complejo abierto).



• **Figura 4-4** Crecimiento en dirección 5' → 3'; a los 12 nucleótidos transcritos, el factor sigma se disocia.



1.7 transcripción eucariota

La iniciación de la transcripción del RNA en eucariontes constituye uno de los pasos más importantes para la expresión génica. Así, las polimerasas de RNA de eucariontes, a diferencia de los procariontes, requieren más de una proteína para reconocer el promotor y desdoblarse la doble hélice del DNA, de modo que conformen un complejo de preiniciación a manera de preparación para la iniciación transcripcional. Así, en la polimerasa tipo I para transcribir el precursor del RNAr que contiene la información correspondiente a RNAr 28S, 18S, 5.8S y pequeños RNA, el gen correspondiente cuenta con dos regiones en el DNA localizadas previo a inicio, un elemento central más cercano a la iniciación y otro elemento de control a –100 pb aproximadamente; estas regiones del DNA se reconocen por dos factores proteínicos de unión al DNA (UBF) necesarios para comenzar la formación del complejo de preiniciación; ambos factores forman un doblamiento del DNA que subsecuentemente permite el reclutamiento de la proteína de unión a la caja TATA (TBP), así como los factores asociados (TAFI), como requisito para que la polimerasa de RNA I pueda unirse y formar dicho complejo de preiniciación .

Para el caso de la polimerasa de RNA III que sintetiza el RNAr 5S, los RNAt y el U6 RNAnp, contiene en el gen correspondiente para el RNAt una región reguladora en el interior de la región que se transcribe conocida como caja A y caja B, regiones reconocidas al mismo tiempo por el factor de transcripción III tipo C (TFIIIC); luego se recluta otro factor de transcripción III tipo B (TFIIB) donde se incluye la proteína TBP para por último permitir la unión de la polimerasa III. Para la transcripción del gen de RNAr y 5S, éste posee una región reguladora que se conoce como caja C localizada en la región después del inicio. Esta región se reconoce por el factor de transcripción III tipo A (TFIIIA) que permite el reclutamiento inmediato del factor TFIIIC seguido del TFIIB para que finalmente la polimerasa de RNA III se una a este complejo multimérico de preiniciación.

Por último, la polimerasa de RNA II encargada de transcribir la gran mayoría de los RNAm de genes tanto constitutivos como inducibles y algunos RNA pequeños nucleares, a diferencia de las polimerasas I y III, requiere un mayor número de factores de transcripción para formar el complejo de preiniciación.

Todos estos factores se denominan TFII (donde TF se refiere a transcription factor y II por la polimerasa II) tipos A, B, D, E, F y H. Es importante destacar que algunos de estos factores se componen por diversas proteínas; así, el TFIID está conformado por la proteína que reconoce, y se une a la caja TATA parte central del promotor (TBP) y diversos factores asociados (12 proteínas pequeñas) a esta proteína conocidos como TAF; una de éstas, conocida como TAF250, posee actividad de acetiltransferasa para la histona, la cual puede por último interferir con la del DNA y de la histona. Cabe señalar que al parecer el TFIIA no es absolutamente necesario para la formación del complejo de preiniciación; sin embargo, en esta ocasión se tomará en cuenta su participación.

El ensamblaje del complejo de preiniciación inicia con la unión del TFIID, que mediante el TBP reconoce y se une al promotor del DNA; una vez posicionado en el DNA, recluta a TFIIB y a TFIIA; en caso de estar presente, antes que la polimerasa de RNA II se una a este complejo, el TFIIIF se unirá a ésta, dado que este factor reconocerá al TFIIB previamente unido al DNA.

Por último, la polimerasa de RNA II recluta a los factores TFIIE y TFIIH en este orden para formar el complejo de preiniciación (PIC, pre-initiation complex) (cuadro 4-3). El factor TFIIH cataliza la fusión del DNA, dado que tres de sus subunidades que lo componen poseen actividades de helicasa, ATPasa y cinasa que permiten utilizar ATP para la abertura del DNA y la fosforilación del dominio carboxiloterminales de la polimerasa de RNA II para iniciar la transcripción

Iniciación

La unión de la polimerasa de RNA II genera un complejo cerrado que se convierte luego en un complejo abierto. Para que comience el movimiento de la enzima, se necesita además un desplegamiento adicional de las cadenas; en este paso, están implicados los factores transcripcionales tipo TFIIE y TFIIH con sus actividades de helicasa. La caja TATA alinea a la polimerasa de RNA a través del factor TFIID y otros factores, de tal modo que se garantiza iniciar en el punto correcto; esto explica por qué la localización de esta secuencia es fija con respecto al punto de inicio.

La unión de TBP a TATA es el hallazgo predominante en el reconocimiento del promotor; también intervienen dos TAF (TAFII250 y TAFII150), que contactan con el DNA en la vecindad del punto de inicio e influyen en la eficiencia de la iniciación. En los promotores TATA, se requieren los mismos factores generales de transcripción, incluyendo TFIID. Aquí, el sitio Inr proporciona el elemento de posicionamiento, y TFIID se une a través de uno o más TAF que reconocen el Inr de manera directa. Aunque in vitro sólo se requieren los factores generales que se ensamblan en el núcleo del promotor (secuencia TATA e Inr), in vivo se necesitan otros factores que reconocen elementos en dirección 5' para que se realice la transcripción. Estos factores son los llamados factores 5' e interactúan con el aparato basal en diferentes etapas durante su ensamblaje.

Factores y elementos 5' Las secuencias que se encuentran más alejadas del sitio de iniciación hacia el extremo 5' (las cajas GC, CAAT y el octámero) se reconocen por los factores 5' para aumentar la eficiencia del suceso de iniciación. La caja GC es reconocida por el factor SPI. La caja GC más cercana suele estar entre 40 y 70 pb en dirección 5' del punto de inicio,

pero el contexto es diferente en cada promotor. El modo más común de uso de los elementos de un promotor es que una secuencia sea reconocida por un determinado factor (o por una familia de factores); no obstante, algunos elementos pueden ser reconocidos por más de un factor.

La caja CAAT puede ser reconocida en promotores diferentes por factores diferentes. Entre éstos se encuentran los de la familia CTF, CPI y CP2 y con los factores C/EBP y ACF. Esta secuencia puede actuar como una diana o blanco específico para la regulación. Así, por ejemplo, en el promotor del gen para la histona H2B sólo se reconoce durante la espermatogénesis en el erizo de mar. Aunque los factores que reconocen esta secuencia se encuentran tanto en la espermatogénesis como en el periodo embrionario, sólo se unen a la secuencia en la espermatogénesis. Durante la embriogenia, hay una proteína (CDP, proteína de desplazamiento del CAAT) que se une a la secuencia e impide la unión del factor correspondiente.

El octámero (Oct) es otra secuencia que puede reconocerse por más de un factor transcripcional. El factor ubicuo Oct-1 se une al octámero para activar los genes de la H2B (y quizás otros también); Oct-1 es el único factor que se une al octámero en tejidos no linfoides. En los de origen linfoide, es un factor diferente; Oct-2 se une al octámero para activar los genes de la cadena ligera de las inmunoglobulinas; así, Oct-2 es un activador específico de tejido, mientras Oct-1 es ubicuo. ¿Por qué el uso de un mismo octámero por dos factores que no tienen el mismo efecto sobre la transcripción? Puede ser que Oct-2 es bastante más necesario para la interacción con otras proteínas que se unen al promotor. Al parecer no basta que se encuentre un factor determinado para predecir si un gen se transcribirá o no; el contexto en que se hallen es otro elemento a tener en cuenta.

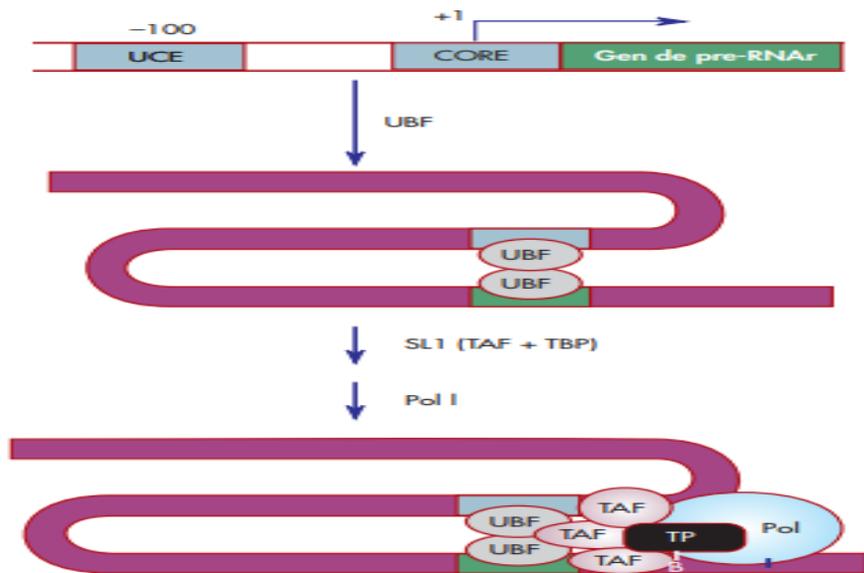
Estimuladores

Los promotores en eucariontes no trabajan solos para asegurar una transcripción eficaz. En algunos genes o tipos celulares, la actividad de un promotor se aumenta por la presencia de otra secuencia conocida como exaltador o estimulador.

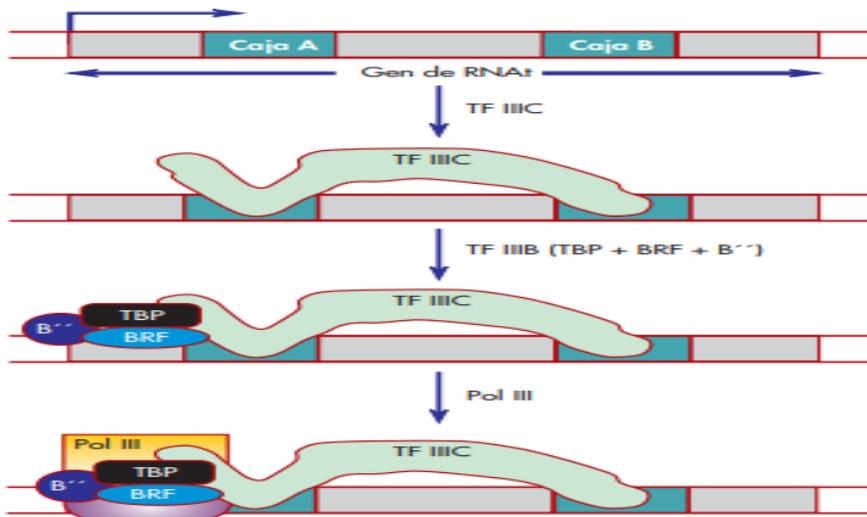
Las características de los estimuladores son las siguientes:

- Están formados por cientos de bases.
- Generalmente, incluyen secuencias repetidas.
- Actúan a distancia, miles de pares de bases del promotor.
- Son activos en cualquier orientación respecto al promotor, incluso suele encontrárselos dentro del mismo gen.

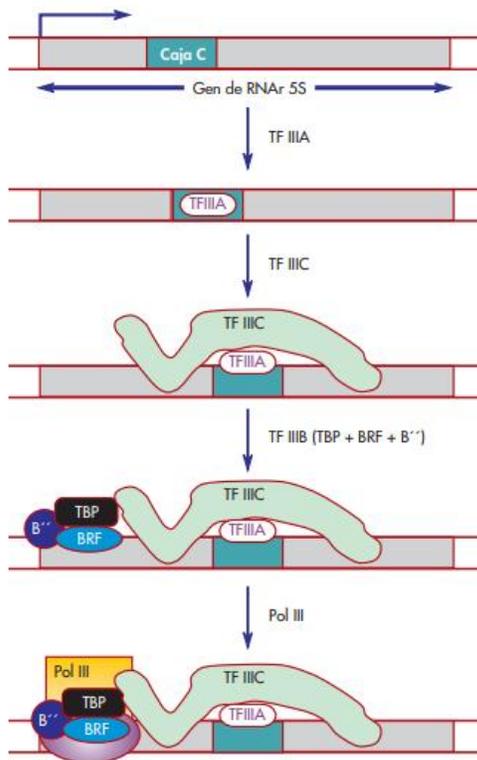
Los estimuladores, entonces, actúan como reguladores de la expresión génica. No está claro aún el mecanismo de acción de los estimuladores, más aun cuando éstos se localizan a cualquier distancia (1 000 a 2 000 pb) y dirección del mencionado promotor.



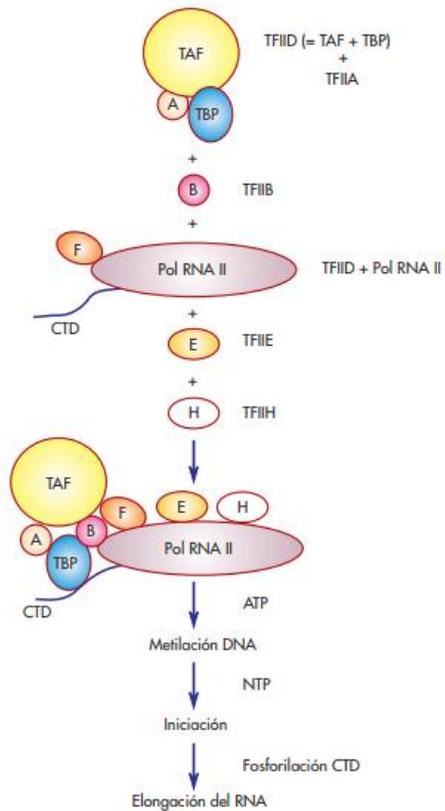
• **Figura 4-6** Estructura del complejo de preiniciación de la polimerasa de RNA tipo I.



• **Figura 4-7** Estructura del complejo de preiniciación de la polimerasa de RNA III para la síntesis del RNAt.



• **Figura 4-8** Complejo de preiniciación de la polimerasa de RNA tipo III para la síntesis del RNAr 5S.



I.8 síntesis de proteínas

Las proteínas, por su tamaño, no pueden atravesar la membrana plasmática de la célula; por eso, existe en su interior un mecanismo que las construye (síntesis) según las necesidades que tenga en ese momento la célula. La síntesis de proteínas o traducción tiene lugar en los ribosomas del citoplasma celular.

Los aminoácidos son transportados por el RNA de transferencia (RNAt), específico para cada uno de ellos, y llevados hasta el RNA mensajero (RNAm), donde se aparean el codón de éste y el anticodón del RNA de transferencia, por complementariedad de bases, y de esta manera se sitúan en la posición que les corresponde. Cuando termina la síntesis de una proteína, el RNAm queda libre y puede leerse de nuevo. De hecho, es muy frecuente que antes que finalice una proteína, se inicia la lectura para otra, con lo cual una misma molécula de RNAm es utilizada por varios ribosomas simultáneamente.

Este proceso es de fundamental importancia, ya que básicamente todas las características que presenta la célula (fenotipo) se regulan por la suma de sus actividades enzimáticas. En pocas palabras, todo lo que la célula es y puede realizar depende de la acción enzimática específica. Como casi todas las enzimas son proteínas, la morfología y funcionamiento celular depende del tipo de proteína que la célula debe armar. Con el transcurso de la evolución, todos los organismos se aseguraron que la información correspondiente para sintetizar sus enzimas específica casi esté presente en sus células y en su descendencia.

CARACTERÍSTICAS DEL RNAT

La síntesis del RNAt se realiza a través de la catálisis de la polimerasa del RNA III tal y como se vio en el capítulo de transcripción. Éste se encuentra disperso por todo el citoplasma; es el más pequeño de los tres tipos de RNA y su estructura tiene forma de hoja de trébol. Los RNAt se estructuran por alrededor de 80 nucleótidos con pesos moleculares de cerca de 25 000 daltones .

Todos los RNAt tienen pG en el extremo 5' y pCpCpA en el extremo 3'. El extremo 3' se conoce como brazo del aminoácido o también brazo de unión al aminoácido o "aceptor".

El correspondiente brazo del anticodón contiene el triplete anticodón, el cual reconoce el codón del RNAm y se relaciona con éste por medio de formación de puentes de hidrógeno, siguiendo las reglas de complementariedad de las bases. Cada tipo de RNAt lleva antepuesto el nombre del aminoácido que transporta.

Por ejemplo, leucinil-RNAt para la leucina, lisinil-RNAt para la lisina, fenilalanilRNAt para la fenilalanina, metionil-RNAt para la metionina, etcétera. Sin embargo, para poder efectuar esta unión y reconocimiento específico del RNAt con su respectivo aminoácido, se necesita la participación de una enzima específica denominada aminoacilsintetasa.

AMINOACILSINTETASA

Es la enzima que cataliza la activación y la unión del aminoácido correcto al RNAt correcto. Son doblemente específica cas por reconocimiento molecular:

1. Para cada aminoácido: reconocen propiedades de carga, hidrofobicidad y tamaño.
2. Para cada RNAt correspondiente: interactúan específicamente con el brazo aceptor y con el brazo del anticodón .
3. Conocen e interpretan el código genético. Así, son capaces de corregir errores, pues contienen sitios especiales de “revisión”; si el aminoácido es incorrecto, se hidrolizan del RNAt y tienen alta fidelidad. Existen 20 aminoacilsintetasas de RNAt diferentes, cada una específica ca para reconocer a un aminoácido y al RNAt compatible con él.

Ambos reconocimientos permiten que cada uno de los 31 tipos de RNAt se una a sólo uno de los 20 aminoácidos utilizados durante la síntesis proteínica. Ello es posible porque cada aminoacilsintetasa de RNAt identifica al RNAt por el anticodón, la parte más específica ca del RNAt

Iniciación

Procariontes Se comienza con la subunidad menor sola. IF-1 se une a la base del sitio A para forzar que el primer fMet-RNAt entre en el sitio P. IF-3 tiene una doble función, ya que se le necesita para estabilizar la subunidad 30S y para que el RNAm interaccione con dicha subunidad. IF-2 (como otros muchos factores de traducción) es del tipo de proteínas G que sirve para depositar el aminoacil-RNAt (fMet-RNAt en este caso) en el ribosoma.

Los tres IF junto con el RNAm, el fMet-RNAt y la subunidad 30S forman el complejo de iniciación. El RNAt iniciador que reconoce el AUG (en ocasiones GUG y rara vez UUG) es especial, ya que porta una formil-Met; presenta modificaciones postranscripcionales específicas; sólo puede usarse en iniciación, y es el único capaz de entrar en el sitio P (no el A) sin la subunidad mayor del ribosoma. La hidrólisis de GTP y la interacción con la subunidad 50S permiten la liberación de los tres factores de iniciación

unirse al sitio A sin EF-Tu, pero a demasiado poca velocidad como para permitir el crecimiento celular.

En la regeneración de EF-Tu interviene el factor de elongación EF-T (ahora EF-1B) que al unirse físicamente a EF-Tu permite el intercambio de GDP por GTP en EFTu: GTP/EF-Tu es la molécula capaz de unir el RNAtaa, en tanto que GDP/EF-Tu no presenta afinidad alguna por él.

Corrección Para dejar el RNAtaa en su sitio, EF-Tu tiene que hidrolizar el GTP. Esto es un proceso relativamente lento (se pueden aislar complejos GTP/EF-Tu/RNAt y GDP/EF-Tu/RNAt), que da tiempo a verificar el apareamiento codón-anticodón. Si es correcto, el GTP se hidroliza y se libera EF-Tu/ GDP, ya que esta molécula ha cambiado su conformación y ahora no presenta afinidad por el RNAtaa sino por el GDP.

Si el apareamiento codón-anticodón es incorrecto, el aminoacil-RNAt se rechaza y queda de nuevo libre el sitio A para aceptar el aminoacil-RNAt correcto. Cuanto más tarde EF-Tu en hidrolizar el GTP, menos errores se cometen en la traducción. Se verifica siempre el apareamiento codón-anticodón, nunca codón-aminoácido

Transpeptidación

La cadena polipeptídica enganchada al RNAt del sitio P se transfiere sobre el aminoácido transportado por el RNAt del sitio A. Esta transferencia la cataliza el sitio peptidiltransferasa de la subunidad 50S. Concretamente, el RNAr 23S alojado en este sitio catalítico es quien realiza la función catalítica fundamental, actuando como ribozima.

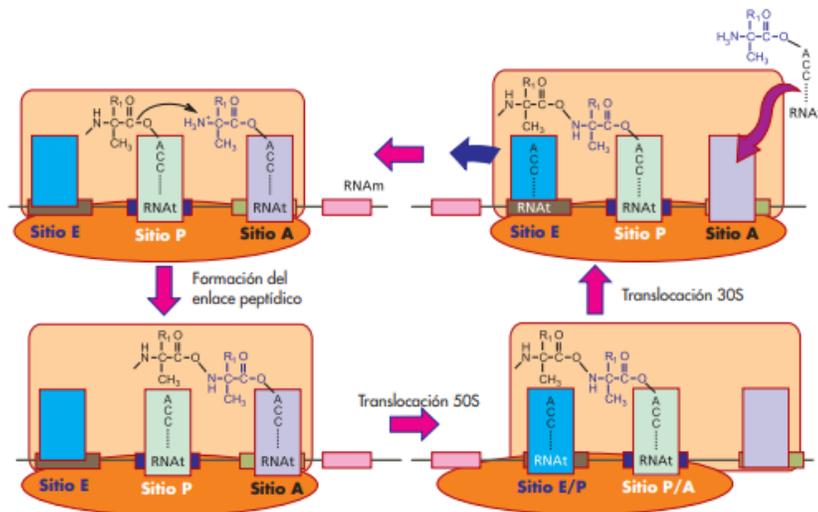
El sitio peptidiltransferasa también impide que la cadena nascente se hidrolice del RNAt al que va unida, evitando la terminación prematura. Lo consigue evitando la entrada de moléculas de agua al centro activo peptidiltransferasa, esencialmente mediante un entorno hidrófobo; esto explica por qué muchos antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas poseen una estructura claramente hidrófoba.

Translocación

El RNAt descargado del sitio P se transfiere al E, y el RNAt que tiene el péptido en el sitio A pasa al P. El desplazamiento hace que el ribosoma avance tres nucleótidos por el RNAm. Ambas subunidades del ribosoma no se trasladan simultáneamente, sino que en primer lugar avanza la subunidad mayor y luego la menor. Para ello, se necesita el factor EF-G (EF-2) que también lleva un GTP unido que se consume con el movimiento.

La estructura de EF-G mimetiza la estructura del complejo GTP/EF-Tu/RNAtaa, por lo que EF-G podría competir con él por el sitio A y desplazar al peptidil-RNAt hacia el sitio P. Por eso, EF-G sólo puede entrar en acción si EF-Tu se ha liberado del ribosoma.

Tras la translocación, la cooperación negativa entre E y A hace que no pueda entrar otro RNAtaa nuevo en A hasta que el que hay en E no ha salido. En este momento, se ha completado el ciclo, con la diferencia de que ahora la cadena polipeptídica ha crecido en un residuo y el ribosoma está desplazado tres nucleótidos en el RNAm



• **Figura 6-9** Representación de la etapa de elongación en procariontes.

Terminación

TERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Al llegar un codón de terminación al sitio A, éste es reconocido por alguno de los factores de liberación; RF1 reconoce los codones UAA y UAG, y RF2 reconoce UAA y UGA. Estos

factores ocupan el sitio A; su estructura recuerda a la del RNAt, y en la parte de la molécula que se sitúa sobre el sitio peptidiltransferasa del ribosoma contiene el motivo Gly-Gly-Gln (GGQ) que lleva coordinada una molécula de agua.

La reacción de fin de traducción consiste en la transferencia del péptido desde el sitio P a dicha molécula de agua. Para sacar los RF1 o RF2 del ribosoma, es necesario que intervenga RF3 (otra proteína de la familia de las GTPasas) e hidrolice una molécula de GTP. RF3 se parece estructuralmente a EF-G. Tal cual ha quedado el ribosoma con el factor RF3 unido, y también el RNAt en el sitio P está estable, pero no se puede utilizar en otra ronda de síntesis.

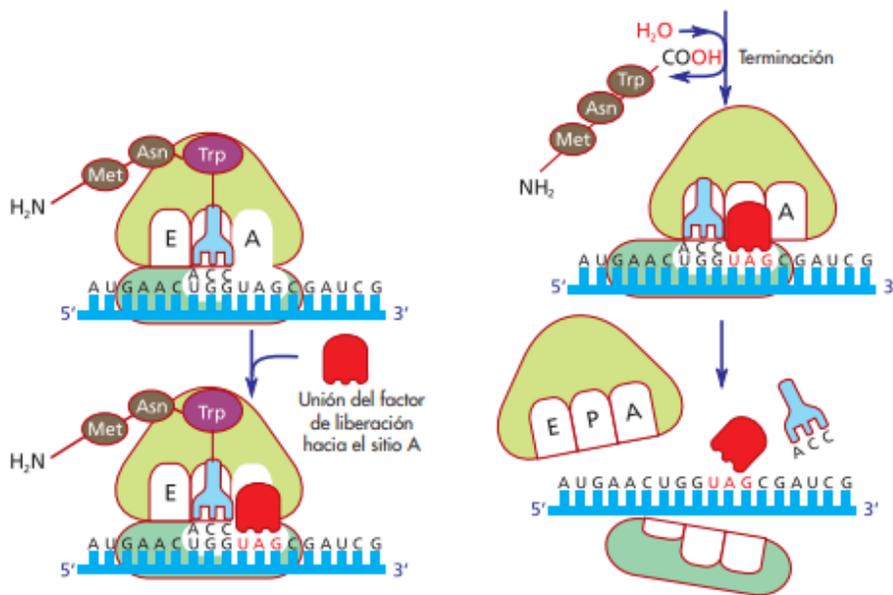


Figura 6-10 Etapa de terminación de la síntesis de proteínas.

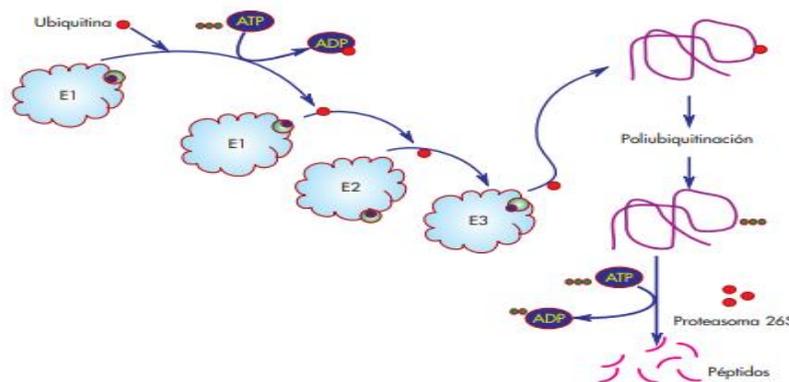
1.9 degradación de la síntesis de proteínas

FIN DE LA SEÑALIZACIÓN DEBIDO A DEGRADACIÓN DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES (VÍA DE UBIQUITINA PROTEASOMA)

La transcripción génica en células eucariontes incluye el armado de un complejo de proteínas en la región promotora y potenciadora del gen, en las cuales interaccionan proteínas del aparato basal de transcripción y factores de transcripción que son regulados por distintas vías de transducción de señales. La actividad de un factor transcripcional puede ser regulada de diferentes maneras: modificando la velocidad de síntesis o degradación, por modificaciones postranscripcionales del factor de transcripción o alterando su localización subcelular.

La proteólisis participa de manera crucial en la regulación de muchos factores transcripcionales. Una forma selectiva y programada de marcar factores transcripcionales para promover su degradación en células eucariontes es mediante el sistema de ubiquitina proteasoma. La ubiquitina es una proteína nuclear y citosólica formada por 76 residuos de aminoácidos que existen en las células de manera libre o unidas de modo covalente a otras proteínas, fue descubierta en timo y se pensó que era una hormona de este órgano; sin embargo, en posteriores investigaciones se encontró en todos los tejidos y en todos los organismos eucariontes y su distribución ubicua dio origen a su nombre. El sistema de ubiquitina proteasoma tiene como proteínas blanco para su degradación: factores transcripcionales, reguladores del crecimiento celular, señales de transducción, reguladores del ciclo celular, proteínas supresoras de tumores, oncoproteínas, enzimas de vida media corta, proteínas víricas y receptores. La degradación de la proteína blanco por el sistema de ubiquitina proteasoma incluye dos pasos distintos y sucesivos: primero unión covalente de múltiples moléculas de ubiquitina a la proteína blanco; segundo, reconocimiento y degradación de la proteína por un complejo proteolítico formado por varias subunidades proteínicas denominado proteasoma 26S. La ubiquitina es liberada en este proceso de degradación, de suerte que puede ser reutilizada en otro ciclo. Los dos pasos de esta vía, el marcaje y la degradación, son reacciones dependientes de ATP. La unión de la ubiquitina marca a la proteína para su rápida degradación, de tal manera que la estabilidad de muchas proteínas se determina por este paso. La ubiquitinación de una proteína es un proceso que comprende varios pasos. Primero, la ubiquitina es activada al unirse a la enzima activadora de ésta, E1; después de esto, es transferida a una segunda enzima llamada enzima conjugadora de ubiquitina, E2. En algunos casos, la ubiquitina es transferida de E2 a la

proteína blanco; sin embargo, en la mayoría de los casos se transfiere a una tercera enzima, la ubiquitina ligasa o E3, y de ahí a la proteína blanco. Casi todas las células poseen sólo un tipo de E1, pero tanto E2 como E3 son miembros de una gran familia de proteínas. Diferentes miembros de las familias de E2 y E3 reconocen diferentes sustratos; esta es la clave para la selección y marcaje de la proteína para su posterior degradación (fi g. 7-20). Diferentes factores transcripcionales y proteínas reguladoras son objeto de degradación de estas vías dentro de los cuales se encuentran las Smad, los componentes de AP-1 “c-Jun” y “c-Fos”, el inhibidor del NF-κB “IκB”. Por otra parte, se ha demostrado que los factores transcripcionales STAT-1 y STAT-2 son degradados por el proteasoma en infecciones víricas como un mecanismo de defensa de los virus contra los efectos del interferón. El interferón se secreta como una citocina que activa la reacción inmunitaria en respuesta a infecciones víricas. La respuesta de las células a los diferentes tipos de interferones incluye la activación de las cinasas JAK y fosforilación de las STAT. Las STAT, como se explicó en la sección correspondiente, dimerizan, translocan al núcleo y activan genes participantes en la respuesta antivírica. Se ha señalado que los paramixovirus bloquean la respuesta del interferón, induciendo la degradación de las STAT. La proteína V del virus 5 de los simios marca a STAT1 para su degradación, en tanto que el virus de la parainfl uenza (paragripal) marca STAT2, induciendo su degradación por el proteasoma



• **Figura 7-20** Vía de ubiquitina proteasoma. La ubiquitina es una proteína que marca a otras proteínas para su degradación por el proteasoma 26S. Primero, se activa al unirse a la enzima activadora, E1. Después de esto, es transferida a una segunda enzima llamada enzima conjugadora, E2. En algunos casos, la ubiquitina es transferida de E2 a la proteína blanco; sin embargo, en la mayoría de los casos es transferida a una tercera enzima, la ligasa o E3, y de ahí a la proteína blanco. La mayoría de las células posee sólo un tipo de E1, pero tanto E2 como E3 son miembros de una gran familia de proteínas. Diferentes miembros de las familias de E2 y E3 reconocen diferentes sustratos; esta es la clave para la selección y marcaje de la proteína para su posterior degradación.

2.0 bases moleculares de la apoptosis

La apoptosis o "muerte celular programada" es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario. Determinados hechos celulares pueden ser explicados por trastornos en la regulación de los genes responsables de la apoptosis, como es el caso de la transformación y la progresión tumorales. En este trabajo se revisaron las características fundamentales de este mecanismo de muerte celular, sus variaciones morfológicas, bioquímicas, los genes involucrados y su papel en el desarrollo de malignidades, entre otros aspectos de interés. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. De ahí que frecuentemente se describa el proceso apoptótico como "suicidio celular" a la hora de definirlo conceptualmente. La metaforización "suicidio celular" es doblemente significativa si se considera que la muerte celular programada es un proceso irreversible, al menos durante sus etapas iniciales. Conceptualmente la apoptosis puede ser considerada opuesta a la muerte celular por necrosis, en la que las células son sujetos pasivos irremediablemente abocados a morir. En este sentido, lo distintivo de la apoptosis radica en el control que ejercen las células sobre su propio destino, cuando "deciden" seguir el camino apoptótico. En condiciones normales la apoptosis constituye un mecanismo fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Por ejemplo: como respuesta frente a la agresión que supone la entrada de un microorganismo, las células encargadas de la defensa del organismo, las células del sistema inmune, son activadas. Dicha activación supondrá, entre otras cosas, la proliferación de aquellas células del sistema inmune capaces de detener de forma específica dicha agresión. Como resultado, buena parte de estas células, que en su momento eran necesarias, dejan entonces de serlo, iniciando muchas de ellas el proceso de muerte celular programada, en este caso inducido por la ausencia del estímulo agresor. En otras palabras, cuando una infección es controlada, gran parte de las células del sistema inmune que contribuyeron a impedir dicha infección, dejan de ser necesarias, siendo eliminado el excedente celular generado por apoptosis.² La apoptosis puede tener dos motivos fundamentales, como parte del desarrollo de estructuras corporales o bien para eliminar células que supongan una amenaza para la

integridad del organismo. Se caracteriza por hipereosinofilia y retracción citoplasmática con fragmentación nuclear (cariorrhexis), desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. Estas señales pueden originarse en la célula misma o de la interacción con otras células.

Mecanismo Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. En el ciclo celular hay cuatro fases: mitosis (M), fase de control celular G₁, síntesis de ADN (S) y fase de control G₂. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G₁ para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN y en la fase G₂ para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis.⁸ Los motores del ciclo celular son complejos proteicos formados por subunidades llamadas ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas (CDK), sintetizados por genes específicos. La síntesis de estos complejos es constante porque son altamente inestables, de ahí que el nivel de ellos varíe de acuerdo al momento evolutivo de la fase a que están asignados. Así en el avance de la fase G₁ a la S actúa la ciclina D asociada a las kinasas ciclinodependientes 2, 4 y 6 (cdk 2 4 6). En la segunda mitad del G₁ aumenta la presencia de ciclina E con la kinasa ciclinodependiente 2. En la fase de síntesis actúa la ciclina A con CDK 2 y en la fase G₂, la ciclina B con CDK 2. En la fase G₁ se han podido determinar dos puntos importantes: G₀ (en la mitad de la fase) donde el ciclo puede detenerse y la célula bloquea su crecimiento pero se mantiene metabólicamente activa y un punto de restricción (en unión de los 2/3 con 1/3 final de esta fase) en que se puede detener el ciclo para corregir defectos celulares (en especial de su ADN), lo que si no se consigue induce el mecanismo de muerte celular.⁹ En la fase G₂ también existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen la apoptosis cuando la célula no está capacitada para entrar en mitosis. De esta manera, durante el ciclo celular se determina cuándo la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción o continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce así un balance entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido.¹⁰ En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales uno de los más importantes y mejor estudiados es el complejo de cisteinil-aspartato proteasas (caspasas). Se han descrito 11 caspasas en

células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos. Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La cadena de degradación proteica tiene sucesivos clivajes dependientes de la ubicación del ácido aspártico que se repite en la estructura de la enzima. Se han descrito hasta 40 sustratos en la catálisis, proceso que en células cultivadas dura entre 30 y 40 minutos. La activación de las caspasas, que existen en calidad de pro-caspasas inactivas, se produce por diversas vías en que participan varios complejos moleculares.

Vía extrínseca La vía extrínseca o de los "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF). La proteína transmembrana Fas en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain), nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula Fas que participa en la muerte celular, activando las caspasas-8 y -10.

En cambio, si la parte interna de la molécula se asocia a otro factor llamado DaXX, se activan proteín-quinasas que conducen al efecto contrario, es decir, estimulan el ciclo celular y la mitosis. Esta vía Fas permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado ligando Fas, proteína que actúa como detonador que enciende una vía en que sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparado para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores. Algo similar sucede con el otro receptor de membrana TNF. Su porción intracelular conecta con complejos intermedios como el Tradd (TNF receptor associated death domain) y Raidd (receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado Traf (TNF receptor associated factor) activan proteínquinasas y estimulan la proliferación celular, es decir, el efecto contrario.

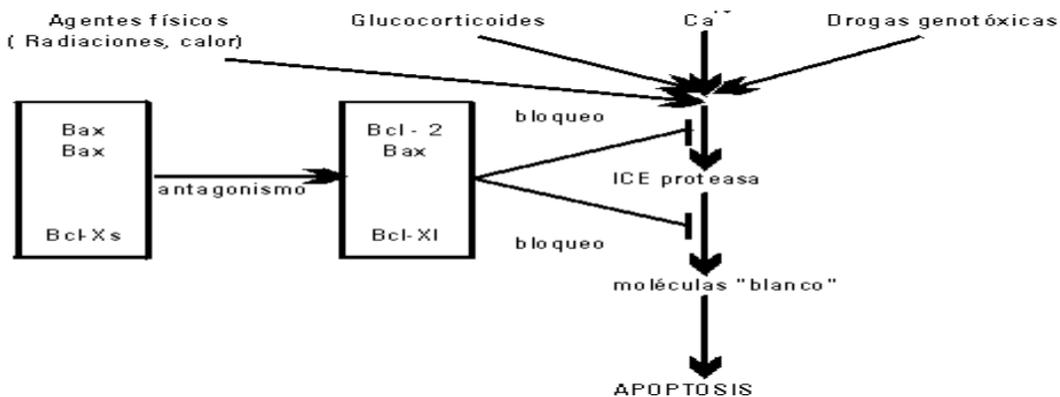
Las alternativas de una misma vía de actuar en pro o en contra de la apoptosis se repiten en otros mecanismos.

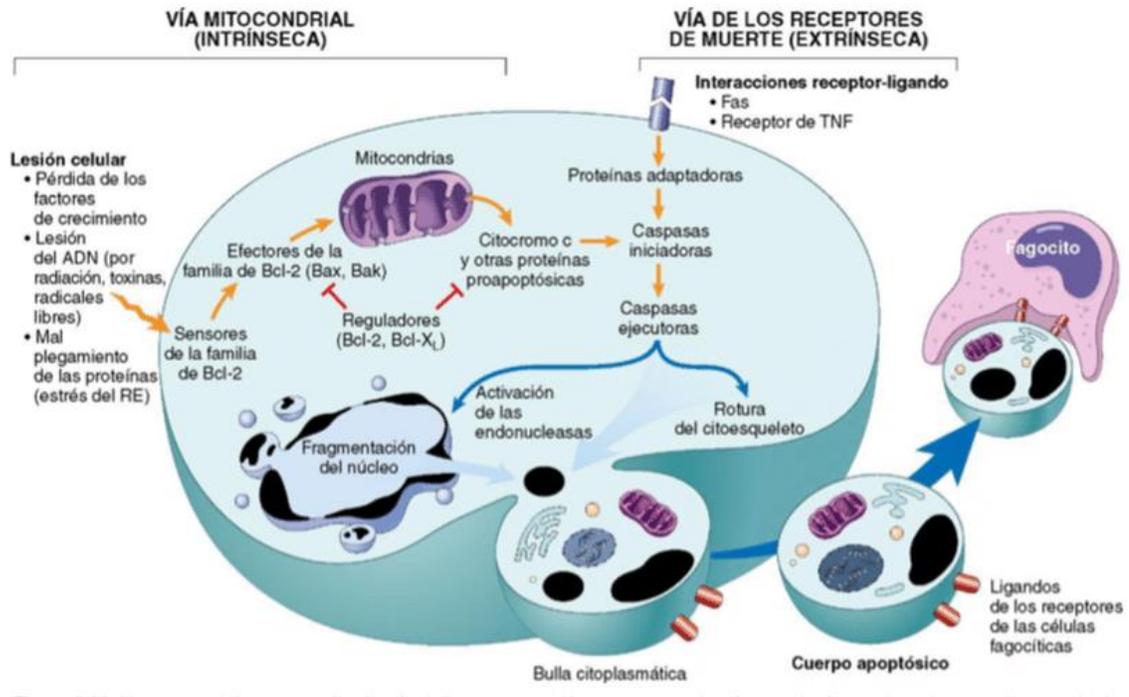
Vía intrínseca o mitocondrial Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c.^{14,15} El citocromo c, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis.¹⁶ El gen bcl-2 forma parte de una familia de genes que intervienen en la regulación de la supervivencia de la célula. Los miembros de la familia Bcl-2 están integrados por: Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-X_L, Bcl-X_S, Mcl-1. El destino de una célula de morir o sobrevivir está determinado por las diferencias en la expresión de estas proteínas, actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis.

Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en tres familias: la familia de las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 y otras); la familia de proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proteínas proapoptóticas de tipo "BH3-only" (Bid, Bim, Bad y otras). Las proteínas tipo multidominio pueden producir poros por si solas en liposomas, lo que indica que probablemente son suficientes para formar el poro mitocondrial que permite la liberación del citocromo c. Las proteínas tipo BH3-only activan a estas proteínas, y las antiapoptóticas inhiben la formación del poro. Estas proteínas son los reguladores más importantes del proceso de apoptosis. Una vez activado el apoptosoma, ocurre este cliva a la procaspasa 3, activándola a caspasa 3 la que es realmente la caspasa efectora; por otro lado a la salida de citocromo c desde la mitocondria, otra proteína llamada SMAC/DIABLO la cual es inhibidor de los inhibidores de caspasas (IAPS) sale de la misma. Así se tiene una vía en la que la caspasa efectora esta libre de actuar (dado que sus inhibidores fueron evitados por SMAC/DIABLO) y la apoptosis continua de forma natural.

El bcl-2 se expresa de manera importante durante estadios muy tempranos de la diferenciación de células B y T, y también está altamente expresado en la etapa de diferenciación final de los linfocitos; es por ello que las células en estadios intermedios de desarrollo son más susceptibles a la muerte celular.¹⁹ Es importante destacar que Bcl-2 no confiere protección a la célula contra la apoptosis, ni en la selección negativa de células autoreactivas del timo, ni en los mecanismos citotóxicos de los linfocitos T citotóxicos (CTL). Tampoco se aprecia su efecto protector sobre las células B inmaduras que sufren apoptosis por entrecruzamiento IgM ni en la activación de la célula vía receptor Fas/TNF.²⁰ La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9.

Figura 1. Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2.



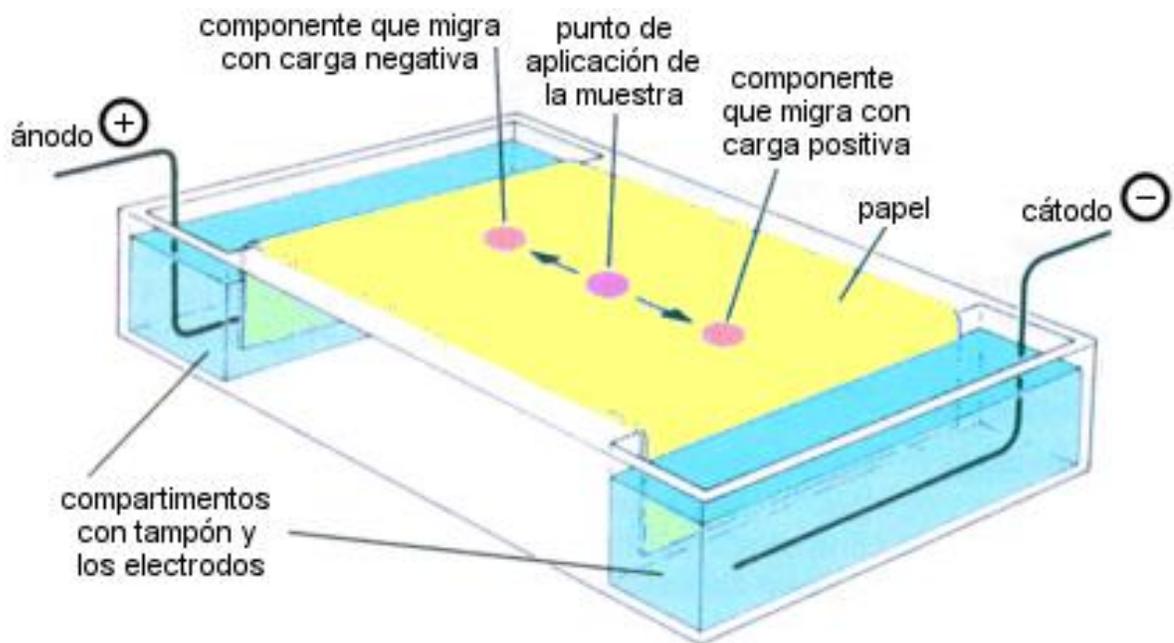


3.0 técnicas de biología molecular

Dadas las características únicas de cada especie también la secuencia de su material genético es única. Por tanto igual que se estudian métodos inmunológicos y bioquímicos las secuencias y estructuras de proteínas como marcadores característicos de los seres vivos también se pueden analizar las secuencias de los ácidos nucleicos.

Por lo tanto en análisis y detección de secuencias de ácidos nucleicos forman la base de todas las aplicaciones de la biología molecular en el diagnóstico clínico.

Características generales de las principales muestras de tejidos y órganos de adultos	
Tejidos tumorales	Para analizar marcadores de membrana (glicoproteínas, receptores, etc.), de citosol (receptores hormonales, etc.) y de núcleo (oncogenes)
Tejido hepático	Rico en DNA (15 µg/mg); para enfermedades metabólicas
Tejido muscular	Pobre en DNA (3 µg/mg); para enzimopatías
Tejido intestinal	Para enzimopatías
Extensiones de piel	Pobre en DNA (3 µg /mg). Se obtiene de zonas no vellosas
Raíz de pelo	Cantidad mínima de DNA (0,5 µg/raíz); con fines forenses; difícil de estudiar
Huesos	Pulpa de los dientes o médula de otros huesos. El tejido óseo se tritura por métodos físicos
Tejidos fijados	Muestras anatomopatológicas, fijadas con formaldehído (formol)
Tejidos incluidos en parafina	Se debe eliminar la parafina empleando disolventes, por ejemplo, xileno o tolueno
DNA antiguo (restos humanos y animales)	Interés arqueológico y antropológico. Debe evitarse la contaminación por DNA exógeno e inhibidores de Taq-polimerasa (que alteran el análisis por PCR)
DNA atrapado	Desde hace millones de años. La resina vegetal (ámbar) mantiene el DNA en perfecto estado



La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza.

Se suele hablar de 3 tipos de electroforesis:

De frente móvil: los componentes de la muestra están presentes en toda la disolución y se determina ópticamente la posición del frente de avance o frontera con el disolvente.

Zonal: la muestra se aplica como una mancha o banda y sus componentes migran a través de un disolvente, utilizando además un medio que da soporte a éste. En este caso no se determina la movilidad, sino que el único objetivo de la técnica es separar los componentes de la muestra.

Continua: la muestra se aplica también en una zona, pero se suministra continuamente a lo largo del proceso.

Northern blot

Es una técnica de detección de moléculas de ácido ribonucleico (ARN) de una secuencia dada dentro de una mezcla compleja.

Aplicaciones

El northern Blot permite observar un patrón particular de expresión genética entre tejidos, órganos, estadios del desarrollo, niveles de estrés ambiental, infecciones causadas por patógenos y durante el curso del tratamiento de las mismas.

Esta técnica se ha utilizado para mostrar la sobreexpresión de oncogenes y la desregulación de genes supresores tumorales en células cancerosas cuando son comparadas con tejidos normales.

Los patrones de expresión obtenidos nos ayudan a conocer las funciones de los genes. Desde que el RNA se separó por su tamaño, las sondas contra el mismo pueden darnos una idea de su tamaño, sugerir ajuste alternativo, o motivos repetidos en la secuencia.

La variación en el tamaño del producto de un gen puede además indicarnos deleciones o errores en el proceso de transcripción.

Alterando la sonda podemos conocer la secuencia e incluso determinar qué región del RNA ha sido deleccionada.

Southern blot

El Southern Blot es una técnica de hibridación que permite identificar fragmentos de ADN separados por electroforesis en gel y transferidos a una membrana de nitrocelulosa o nylon.

Permite la detección simultánea de varias secuencias diana de distintos tamaños con una única hibridación. Típicamente se utilizan sondas radiactivas.

Antes de poder realizar el Southern blot propiamente dicho hay que extraer y purificar el ADN. Ésta puede ser tanto de tejido animal, vegetal, etc. Las técnicas de extracción son muy diversas.

Existen protocolos de extracción especializados para muchos tipos de tejidos diferentes o tipos celulares. Una vez obtenido un ADN purificado se corta con enzimas de restricción para obtener fragmentos de diferentes tamaños.

Una vez tenemos el ADN digerido con enzimas y en cantidad suficiente se corre una electroforesis en un gel de agarosa para separar los diferentes fragmentos de ADN según su tamaño.

Reacción en cadena de la polimerasa

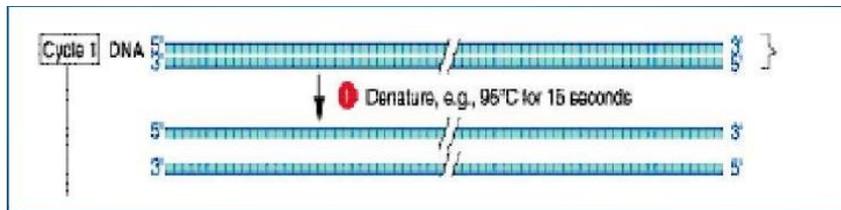
Es la amplificación de ADN in vitro por medio de la polimeración de cadena de ADN utilizando un termociclador.

- Es propósito del PCR es hacer muchas copias de un fragmento de ADN
- Se realiza la amplificación de un segmento específico de ADN, teniendo poco material disponible.

Pasos

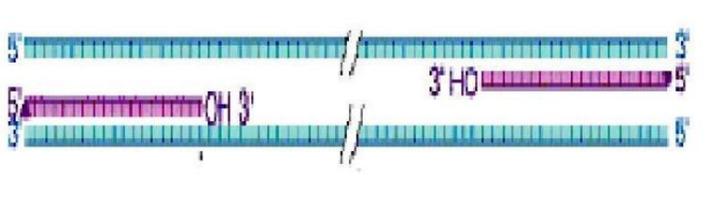
DESNATURALIZACION

Consiste en separar la doble hebra de ADN y convertirla en hebra sencilla. Típicamente se usa a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}$, Por 15 a 40 segundos El tiempo depende del tamaño del genoma



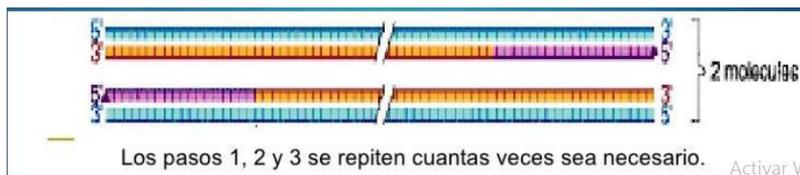
APAREAMIENTO O "ANNEALING"

Los cebadores "primers" previamente diseñados, reaccionan con la hebra sencilla del ADN y se pega a lugares específicos por complementariedad de base. Por eso se deja bajar la temperatura Ej: 55°C por 30 segundos. La temperatura y el tiempo puede variar entre cebadores según sea el caso.



POLIMERACION O EXTENSION.

Una polimerasa de ADN extiende los “primers” en el espacio comprendido entre ambos “primers”, y coloca dinucleotidos trifosfatados (dNTP’s) de 5’a 3’leyendo el ADN de 3’a 5. de esta forma se sintetiza la secuencia complementaria de las hebras de ADN molde.



Aplicaciones

Detección de agentes infecciosos como : hepatitis B y C, papiloma virus, VIH, entre otros.

- Análisis de ADN de cualquier organismo vivo o muerto, análisis de fósiles.
- Mutagénesis dirigida (cambios en la información contenida a través de los “primers” con mutaciones)
- Investigación forense
- Pruebas de paternidad

Ventajas

- A partir de una muestra pequeña de ADN se puede obtener una cantidad considerable para el estudio que se vaya a realizar.
- El proceso se puede utilizar para clonar, secuenciar y análisis.
- Se puede amplificar el ADN de cualquier organismo vivo o muerto.
- Sus aplicaciones son múltiples, medicina forense, diagnóstico, análisis prenatales, etc.

Desventajas

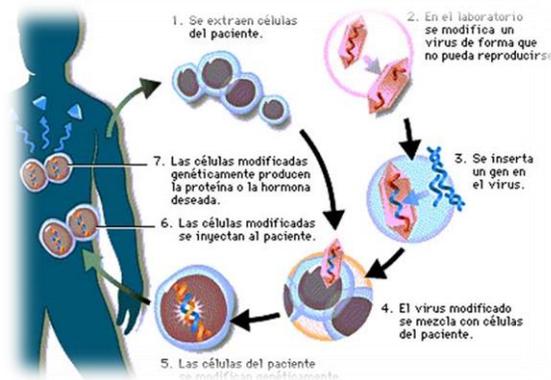
Se puede reproducir solamente parte del genoma en donde se conoce por lo menos una mínima secuencia 20 – 40 pd.

- Se necesitan “primers” específicos que sean complementarios al fragmento que se desea sintetizar.
- La polimeración puede tener errores al sintetizar el ADN.
- Puede contaminarse con otro ADN (puede ser del mismo investigador o de cualquier otro)

4.0 Terapia génica

En la actualidad, la dotación genética de una célula puede ser modificada mediante la introducción de un gen normal en el organismo diana que sustituya al gen defectuoso en su función; es lo que se denomina terapia génica.

La terapia génica se puede definir como el conjunto de técnicas que permiten vehicular secuencias de ADN o de ARN al interior de células diana, con objeto de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico que ello produce.



En función del tipo celular diana, existen dos modalidades de terapia génica

Terapia génica de células germinales: aquella dirigida a modificar la dotación genética de las células implicadas en la formación de óvulos y espermatozoides y, por tanto, transmisible a la descendencia.

Este tipo de terapia génica sería la indicada para corregir de forma definitiva las enfermedades congénitas, una vez que la técnica sea eficaz y segura, situación que no parece darse en el momento actual.

Terapia génica somática: aquella dirigida a modificar la dotación genética de células no germinales, es decir, de las células somáticas o constituyentes del organismo. Por ello, la modificación genética no puede transmitirse a la descendencia.

En función de la estrategia aplicada, la terapia génica también puede clasificarse en:

Terapia génica in vivo: agrupa la técnicas en las que el material genético se introduce directamente en las células del organismo, sin que se produzca su extracción ni manipulación in vitro. La gran ventaja de las técnicas in vivo sobre la terapia génica in vitro es su mayor sencillez.

Terapia génica ex vivo : comprende todos aquellos protocolos en los que las células a tratar son extraídas del paciente, aisladas, crecidas en cultivo y sometidas al proceso de transferencia in vitro.

Métodos de transferencia

Para alcanzar un determinado efecto biológico en terapia génica es necesario introducir de manera eficaz la secuencia génica de interés en la célula diana y conseguir su expresión.

Estos objetivos suponen contar con un adecuado sistema de vehiculización o transferencia y, al mismo tiempo, disponer de promotores adecuados para conseguir la máxima expresión del gen insertado en la célula.

Tabla 1. Métodos físico-químicos de transferencia génica.

Microinyección
Precipitación con fosfato cálcico
Electroporación
Bombardeo con microproyectiles
Inyección directa de ADN “desnudo”
Conjugados ADN-proteínas
Conjugados ADN-adenovirus
Liposomas

Tabla 2. Vectores virales de transferencia génica.

Adenovirus
 Virus adenoasociados
 Virus vaccinia
 Herpesvirus
 Retrovirus

Tabla 3. Enfermedades monogénicas en las que se aplican protocolos clínicos de terapia génica.

Enfermedad	Gen alterado
Inmunodeficiencia combinada grave	Adenosina desaminasa
Enfisema	α 1-antitripsina
Citrulinemia	Arginosuccinato sintetasa
Deficiencia de adhesión leucocitaria	CD 18
Fibrosis quística	CFTR
Hemofilia A	Factor VIII
Hemofilia B	Factor IX
Talasemia	β -globina
Anemia falciforme	β -globina
Enfermedad de Gaucher	glucocerebrosidasa
Mucopolisacaridosis tipo I	α -L-iduronidasa
Mucopolisacaridosis tipo IV	β -glucuronidasa
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa
Fucosidosis	α -L-fucosidasa
Hipercolesterolemia familiar	Receptor LDL
Hiperamonemia	Ornitina transcarbamilasa
Fenilcetonuria	Fenilalanina hidroxilasa
Distrofia muscular de Duchenne	Distrofina

4.1 terapia génica en enfermedades neurodegenerativas

En los últimos cinco años, las estrategias sobre la transferencia de genes se han estado integrando a las investigaciones de la función del cerebro con un enfoque sobre los mecanismos celular y molecular del desarrollo neuronal, la plasticidad y la degeneración. Estas técnicas también se estudian como estrategias de

tratamiento prospectivo de diversas enfermedades neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer, Huntington, epilepsia, etcétera. Hoy en día, ha habido un progreso considerable en el desarrollo de vectores víricos eficientes y seguros que permite la transferencia de genes a células del cerebro, así como el surgimiento de técnicas de trasplante de células de tipo neuronales, no neuronales (Ridet et al., 1999) y células progenitoras (Ross et al., 1999) que son modificadas genéticamente para liberar productos de genes terapéuticos al sistema nervioso central.

Sin embargo, una de las preocupaciones fundamentales en el desarrollo de estas tecnologías consiste en evitar los efectos secundarios no deseados, mismos que pueden ser inducidos por los productos de genes. Por tanto, el esclarecimiento de la estructura y organización de genes promotores y la presencia de elementos reguladores asociados a éstos indican un alto grado de regulación del aparato transcripcional, con lo que puede permitir la regulación de la expresión de estos genes por algunos fármacos. Por otro lado, con el surgimiento de estas tecnologías, ha sido posible la creación de modelos animales transgénicos, lo que permite evaluar los efectos de la adición, alteración o eliminación de genes individuales tanto constitutivos como inducibles participantes en la etiopatología y fisiopatología de algunas enfermedades neurológicas, como la esquizofrenia. Por esta razón, el presente capítulo pretende dar a conocer algunos de los mecanismos básicos de los procesos neurodegenerativos, la caracterización de algunos trastornos homónimos, así como los modelos de estudio en la aplicación de la terapia génica para su tratamiento y por último se presenta una visión de los más recientes avances en el conocimiento de la enfermedad de Alzheimer.

Enfermedades neurodegenerativas

Curso clínico La corea de Huntington (CH) se caracteriza por una tríada de anormalidades motoras, emocionales y cognitivas. Los síntomas por lo general

inician entre los 35 y 50 años de edad, aunque se pueden presentar desde la edad juvenil hasta la adulta. De manera característica, la muerte ocurre 15 a 20 años después de los primeros síntomas; a diferencia de Alzheimer, los pacientes con CH son capaces de recordar sucesos de la memoria más que almacenarlos en ésta. Con frecuencia, presentan síntomas psiquiátricos, entre ellos depresión, irritabilidad y apatía. La expresión conductual de estos síntomas puede incluir impulsividad explosiva, retiro social y suicidio. En resumen, el adulto con CH pasa por tres etapas: la etapa inicial, que incluye manifestaciones con cambios sutiles de coordinación en movimientos involuntarios; dificultad para pensar y resolver problemas con humor irritable o depresión. En la etapa intermedia, los movimientos motores voluntarios son más difíciles y presentan disfagia y disartria, algunas veces con deficiencias cognitivas. En la etapa avanzada, se presenta mayor rigidez, bradicinesia con demencia global; sin embargo, no hay un tratamiento específica que permita una reducción en la progresión clínica de la CH (Ross et al., 2006).

Aspectos moleculares El gen para la CH (IT15 o huntingtina) se identificó en 1993 (Ross et al., 2006). La mutación consiste en una expansión repetitiva del codón CAG en el gen correspondiente, mismo que consta de 67 exones tanto en el ratón como en el ser humano; se localiza entre los marcadores D4S127 y D4S180 del cromosoma 4p16.3 sobre una región genómica de 900 kb y se transcribe en dos versiones del RNAm que varían sólo en la longitud del extremo 3' de la región sin transducir. El gen codifica para una proteína de 350 kDa con poca homología respecto a proteínas conocidas. Estudios de inmunocitoquímica demuestran que la huntingtina está presente en el soma neuronal, dendritas y terminales nerviosas asociada con elementos de citoesqueleto y vesículas intracelulares. La mayoría de los pacientes jóvenes con CH posee 60 o más tripletes de CAG, en tanto que el límite normal tiene 29 tripletes. De esta forma, la proteína correspondiente que se sintetiza de este gen, la huntingtina, posee un segmento de poliglutamina; se localiza en inclusiones intranucleares, citoplásmicas y en neuritas distróficas (DiFiglia et al., 1997).

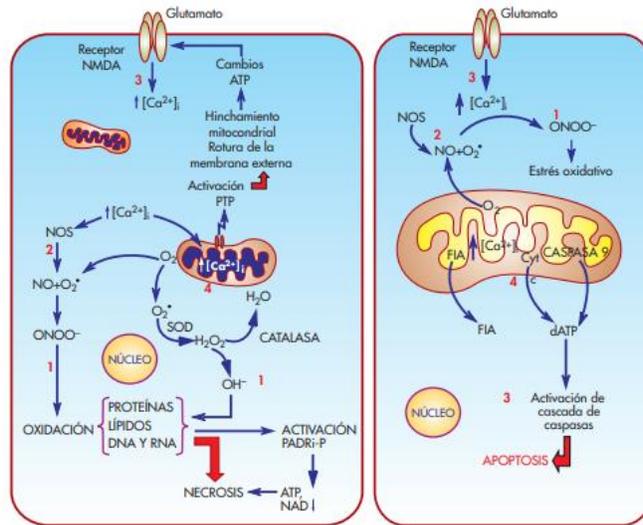
Neuropatología La CH se caracteriza por una atrofia y pérdida selectiva de

neuronas en el SNC, sobre todo en caudado y putamen que conforman el estriado, así como en la corteza cerebral, en particular la materia blanca y otras regiones cerebrales, lo que permite una pérdida del peso cerebral de 25 a 30% en los casos avanzados. En el estriado, hay una pérdida importante de neuronas de proyección de espinas medianas que sintetizan GABA y encefalinas; este suceso se acompaña de astrocitosis reactiva (Kowall et al., 1987). En la corteza cerebral, las neuronas grandes de las capas III y V de proyección al tálamo son gravemente afectadas. De esta manera, la mayoría de los síntomas clínicos de la CH se correlaciona con la enfermedad de los ganglios basales y de la corteza cerebral. La neurodegeneración también se observa en otras regiones, como el cerebelo, el tallo encefálico, el hipotálamo, la amígdala y porciones del tálamo; sin embargo, la relación entre estos cambios y las características clínicas no es clara.

Neurotoxicología La administración de agonistas del receptor NMDA, como el ácido quinolínico, al estriado produce una enfermedad semejante a la CH, así como la administración de toxinas mitocondriales como el ácido 3-nitropropiónico. Así, estos experimentos sugieren varias vías metabólicas para inducir la muerte de neuronas en la CH, por lo cual tanto la excitotoxicidad como el envenenamiento metabólico pueden ser mediados en parte por radicales libres que tal vez incrementen la muerte neuronal programada, mejor conocida como apoptosis; ésta a su vez es posible sea desencadenada por un grupo de proteasas de aspartato, llamadas caspasas y GAPDH que sirven como factores iniciadores. También se han encontrado, en cerebros obtenidos de individuos postmortem con CH, notorias deficiencias en la actividad del complejo II, III y IV mitocondrial (Gu et al., 1996). Sin embargo, en un intento por conocer mejor el papel funcional de la huntingtina y la patogenia de la CH, se ha estudiado la interacción de ésta con otras proteínas que contienen glutamina de manera repetitiva, como es el caso de la enzima GAPDH, así como algunos correpresores nucleares y factores de transcripción, proteínas que participan en la regulación del desarrollo y la neurogénesis del SNC. Así, el acceso terapéutico para la CH, que hasta el momento se ha limitado a tratamientos sintomáticos, puede estar dirigido hacia diferentes niveles tal como

lo proponen Margolis y Ross (2001; 2003), en donde se consideran los aspectos metabólicos mitocondriales, con antioxidantes y fármacos que inhiben proteasas como la excitotoxicidad como la apoptosis.

Capítulo 11 Terapia génica en enfermedades neurodegenerativas



Esclerosis lateral amiotrófica

Curso clínico

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se caracteriza por una parálisis crónicamente progresiva y letal, que se debe a una muerte de neuronas motoras del neuroeje, esto es, la médula espinal, la corteza y el tallo encefálico. Las causas se desconocen, pero la mayoría de los casos inicia entre los 50 y 55 años de edad del individuo y la supervivencia promedio a la ELA es de tres a cinco años, en tanto que casi todos los casos son esporádicos; de 5 a 10% se transmiten por una característica autosómica dominante. Las características clínicas de la ELA se definen según el tipo de muerte de neuronas motoras. Así, cuando inicia con la muerte de neuronas motoras bajas, hay signos de músculo punzante y debilidad. Si las neuronas motoras superiores de los fascículos corticoespinales resultan con degeneración y muerte, se presenta debilidad y espasticidad. Esta pérdida de neuronas se acompaña de astrogliosis significativa. Otra característica es que se

presentan agregados focales de proteínas de citoesqueleto tanto en los somas neuronales como en los axones proximales.

Aspectos moleculares

En un grupo de familias que presentaron la ELA se encontró una mutación del gen que codifica para la enzima dismutasa de superóxido citosólica (SOD1) (Juneja et al., 1997). Este gen se localiza en el cromosoma 21q22. En la actualidad se han identificado más de 80 mutaciones de este gen de la SOD1. La SOD1 es una metaloproteína con 153 aminoácidos que cataliza la conversión del anión superóxido O_2^- a peróxido de hidrógeno H_2O_2 (fig. 11-3). Así, se le considera para funcionar como antioxidante; luego, el H_2O_2 se convierte en H_2O por la catalasa o la reductasa de glutatión. La SOD1 es altamente conservada y se expresa de manera ubicua. Neuropatología Estudios moleculares y anatómicos demuestran que las neuronas motoras son más vulnerables a la neurodegeneración que otras; estas neuronas son de cuerpo celular y prolongación axónica grandes, lo que requiere de altas demandas energéticas y por tanto gran actividad mitocondrial y de un citoesqueleto robusto.

Una característica de estas neuronas para ser susceptibles al daño excitotóxico es la presencia de receptores a glutamato del tipo AMPA; estos receptores son los encargados de la transmisión excitadora rápida en el SNC y se conforman de cuatro subunidades, GluR1-GluR4. La presencia de la subunidad GluR2 hace al receptor impermeable al ingreso de calcio hacia la neurona. Este hecho puede implicar que las neuronas sean más permeables al calcio a través de la activación del receptor AMPA y por ello más vulnerables a la excitotoxicidad del glutamato. Otra característica es la carencia de proteínas que unen calcio del tipo D28k y parvalbúmina, proteínas que amortiguan la concentración de calcio intracelular y evitan el daño a neuronas.

La observación de que la actividad de la SODI cerebral se encuentra reducida en algunos casos de ELA sugiere que un mecanismo de toxicidad se debe a una mutación

Enfermedad de Alzheimer

Curso clínico

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por dos aspectos morfológicos: uno es la presencia de placas neuríticas extracelulares denominadas placas seniles en la región cortical e hipocámpal. Estas placas seniles son depósitos compactos de una cadena peptídica denominada amiloide β (β -A).

El segundo es la presencia de una estructura ramificada de neurofibrillas intracelulares que ocupan gran parte del citoplasma de las células piramidales, cuyo principal componente es una proteína insoluble e hiperfosforilada llamada τ (tau) asociada a los microtúbulos. La característica principal de la EA es una pérdida progresiva de neuronas con atrofia cerebral en regiones específicas, particularmente la proyección colinérgica de los núcleos basales de Meynert hacia la corteza cerebral. Diversos estudios demuestran la deficiencia en el aprendizaje y la memoria que se observa en pacientes con EA; esta pérdida de neuronas es paralela con la reducción de marcadores colinérgicos, como los receptores nicotínicos, muscarínicos, la enzima acetiltransferasa de colina y los niveles de acetilcolina; estos cambios se correlacionan con el grado de demencia y la extensión neuropatológica en el cerebro. Con la tomografía por emisión de positrones con el uso de glucosa marcada con ^{18}F /FDG, ha sido posible conocer que la EA también está relacionada con considerables cambios en el metabolismo de la glucosa y energético cerebral.

Esto ha emitido la hipótesis de que la patogenia inicial de la EA esporádica puede ser una disfunción en la transducción del receptor neuronal a insulina (Hoyer, 2000). Sin embargo, a partir de las plaquetas seniles en cerebros con EA, también se ha vinculado con células de la microglia activadas y astrocitos reactivos como

reacción inflamatoria en la patogenia de la EA. En este sentido, hay datos de que la β -A puede promover la inflamación a través de la liberación de mediadores inmunes por los neuroglíocitos (McGeer et al., 2000; McGeer, 2000). Aspectos moleculares El mayor componente de las placas neuríticas es un péptido de β -A de 4 kDa que se deriva de una proteína mayor denominada precursor de la proteína amiloide (PPA). Ésta pertenece a una familia de proteínas transmembrana glucosiladas que se expresan de manera ubicua y abundante en el cerebro; también hay diversas isoformas derivadas de la edición de los exones 16 y 17 del gen de la β -A y que se localiza en el cromosoma 21 (Selkoe, 2000; Hardy, 2001). La estructura del PPA consiste en un dominio extracelular largo y una región embebida en la membrana plasmática y una región corta intracelular que posee el carboxilo terminal.

La proteína precursora posee una secuencia de 39 a 42 aminoácidos de la β -A y se procesa para ser secretada, o una vía endosomal/lisosomal, formando productos no amiloidógenos por degradación o péptidos amiloidógenos β , respectivamente. Para generar el β -A, el PPA debe ser cortado por dos proteasas que también se han denominado secretasas β y γ . El corte por la secretasa β produce un PPA truncado, pero este fragmento también se corta por la secretasa γ en el aminoácido 711 o 713 para producir β -A1-40 o β -A1-42, respectivamente (fig. 11-5). La vía secretora no amiloidógena incluye la degradación proteolítica del PPA por una secretasa α entre las posiciones de los aminoácidos 17 y 17 del dominio del β -A que resulta en la liberación del ectodominio del PPA, llamado sPPA- α . El segmento restante anclado en la membrana de 83 aminoácidos del PPA se degrada por una secretasa γ para producir el péptido p3 (Sinha et al., 1999; Selkoe, 2000b).

Estudios recientes se han enfocado sobre la caracterización de las secretasas que procesan el PPA, ya que la estimulación de la secretasa α o la inhibición de las secretasas β o γ pueden representar estrategias terapéuticas en la EA. También diversos estudios han sugerido que las presenilinas pueden ser secretasas γ

(Haass y De Strooper, 1999). Recientemente, otra proteína, la nicastrina, se ha identificado para participar en el procesamiento del PPA mediado por presenilina (Schenk, 2000). Aspectos neuroquímicos Hay una fuerte evidencia de que el procesamiento de PPA se controla por la activación de diversos receptores para neurotransmisores acoplados a la cinasa de proteína C, ya que la liberación de sPPA- α se incrementa por estimulación de los receptores muscarínicos de los subtipos m1 y m3, pero no del m2 y el m4.

La activación de los receptores muscarínicos en células transfectadas con receptores humanos de los subtipos m1 o m3 incrementa la secreción de sPPA- α , pero disminuye la liberación de β -A, lo que sugiere que la actividad colinérgica normal puede suprimir la formación de potenciales derivados amiloidógenos. También la activación de la cinasa de proteína C por ésteres del forbol aumenta la secreción de sPPA- α , indicando que los receptores muscarínicos median su efecto sobre el procesamiento de PPA mediante la activación de la vía del fosfatidilinositol.

La secreción de sPPA- α se incrementa por estímulo eléctrico en rebanadas de tejido de hipocampo, corteza, estriado y cerebelo, el cual puede inhibirse por la tetrodotoxina, un antagonista de canales del sodio. De igual modo, estudios in vivo de lesión colinérgica selectiva proveen de una fuerte evidencia de que el procesamiento del PPA se controla por la actividad de estas neuronas colinérgicas que se originan en el encéfalo basal.

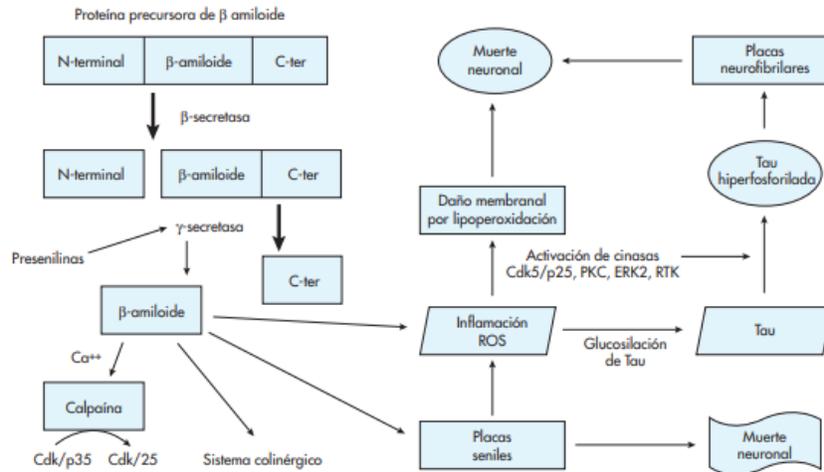


Figura 11-5 Cascada de sucesos que finalmente resultaría en la degeneración neuronal en la enfermedad de Alzheimer. La explicación se proporciona en el texto. ROS, especies reactivas de oxígeno; Cdk, cinasa dependiente de ciclina; C-ter, terminal C de la proteína precursora amiloide; PKC, cinasa de proteína C; ERK, cinasa reguladora de señal extracelular; RTK, receptor cinasa de tirosina.

Modelos de terapia génica neurodegenerativa

Cuadro 11-5 Modelos de estudio en perspectiva de terapia génica para diversas enfermedades neurodegenerativas

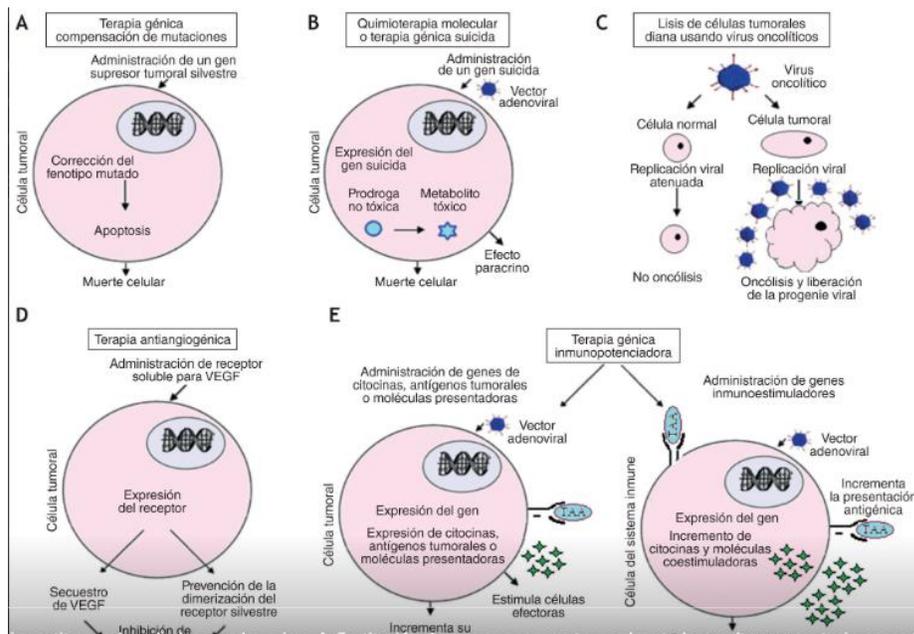
Tipo de enfermedad	Posibles genes deficientes	Efectos	Modelos de estudio	Referencias
Esclerosis lateral amiotrófica	Factor neurotrófico derivado de la neuroglia (GDNF) y el ciliar (CNF), IGF-1, Bcl-2, Bcl-xl	Neuronas DAérgicas y motoras	Implantación de mioblastos con vector adenoviral con gen para GDNF y CNF	Bohn <i>et al.</i> , 2000 Aebischer <i>et al.</i> , 1996; Maimone <i>et al.</i> , 2001
Mucopolisacaridosis tipo VII	β-Glucuronidasa	Anormalidad en órganos periféricos y SNC	Implantación de microcápsulas intraventriculo lateral	Ross <i>et al.</i> , 2000
Huntington	Desconocido Factores neurotróficos: ciliar (CNF), derivado del cerebro (GDNF), crecimiento (NWF)	Neuronas GABAérgicas de estriado	Implante intraventricular de microcápsulas con células productoras de CNF; adenovirus con GDNF, NWF	Bachoud-Levi <i>et al.</i> , 2000; Bemelmans <i>et al.</i> , 1999; Kordower <i>et al.</i> , 1999
Parkinson	Desconocido; sinucleína α; parkina ubiquitina carboxiterminal hidrolasa-L1; descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DAA), hidroxilasa de tirosina (TH), receptor D2,	Pérdida de neuronas DAérgicas en estriado	Inyección de adenovirus con el gen de: GDNF, DAA, TH, R-D2, dismutasa de superóxido, neurotrofina 3, ciclohidrolasa 1 de GTP, Bcl-2	Connor <i>et al.</i> , 1999; Leff <i>et al.</i> , 1999; Xu <i>et al.</i> , 1998; Ikari, <i>et al.</i> , 1999; Barkats <i>et al.</i> , 1998; Kang, 1998; Offen <i>et al.</i> , 1998; Maimone <i>et al.</i> , 2001.
Canavan	Aspartoacilasa (ASPA)	Aumento de ácido N-acetilaspártico en SNC con retraso mental y muerte	Ratón deficiente (<i>knock out</i>) en ASPA Adenovirus con ASPA recombinante en cápsulas policatiónicas condensadas	Matalon <i>et al.</i> , 2000. Leone <i>et al.</i> , 2000
Alzheimer	Desconocido Proteína amiloide β, y su precursora; secretasas τ	Pérdida de neuronas colinérgicas de los núcleos basales de Mayner	Implantación de fibroblastos con adenovirus que transporta factor de crecimiento nervioso, ApoE	Blesch y Tuszynski, 1995; Baum <i>et al.</i> , 2000

4.2 Biología molecular del cáncer

Terapia génica contra el cáncer

La transformación maligna es un proceso secuencial mediante el cual una célula adquiere nuevas características que le permiten proliferar sin control e invadir localmente y a distancia. Estas características pueden ser dianas para el diseño de terapias que eliminen las células tumorales, mejoren la respuesta inmune o bloqueen la proliferación tumoral.

La eliminación de células tumorales puede llevarse a cabo mediante la terapia por compensación de mutaciones (corrección de genes supresores de tumor o inhibición de oncogenes activados); la terapia génica suicida (infección del tumor con un virus de replicación selectiva que codifique una enzima capaz de activar un profármaco en el tumor) y la terapia oncolítica (infección de las células tumorales con un virus lítico). La respuesta inmune del huésped se puede mejorar mediante una terapia inmunopotenciadora (que incremente la inmunogenicidad del tumor o potencie la actividad antitumoral de las células del sistema inmune), y la proliferación de células tumorales se puede inhibir mediante una terapia antiangiogénesis.



Terapia génica por compensación de mutaciones

Dado que la mayoría de mutaciones que conducen al desarrollo tumoral afectan a protooncogenes, genes supresores de tumor y genes reparadores del ADN, y teniendo en cuenta que estas mutaciones son comunes a muchos tumores, el restablecimiento de su función normal puede ser diana de una terapia génica contra el cáncer. Por ejemplo, el gen p53, se encuentra mutado en más del 50% de tumores, y su expresión normal puede restablecerse mediante un adenovirus que codifique la copia silvestre del mismo (Ad-p53). En cáncer de próstata y de cuello uterino, Ad-p53 inhibe el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*, y en osteosarcoma, incrementa la sensibilidad al cisplatino y la doxorubicina.

Un ensayo preclínico en cáncer de pulmón demuestra que Ad-p53 induce la regresión tumoral con una toxicidad aceptable cuando se usa solo o en combinación con radioterapia y/o quimioterapia, y en carcinoma hepático, Ad-p53 combinado con TRAIL exógeno incrementa la muerte celular por apoptosis, lo que demuestra que Ad-p53 ejerce un efecto antitumoral sinérgico al administrarse combinado con los tratamientos tradicionales de quimio/radioterapia o con nuevos medicamentos antitumorales, maximizando la eliminación del tumor, y minimizando los efectos colaterales.

Debido al excelente perfil de seguridad y a los efectos antitumorales significativos obtenidos con estos vectores, se han conducido más de 100 ensayos clínicos (fase I-III) utilizando Ad-p53. La primera patente de terapia génica utilizando Ad-p53 (Gendicine®), contra el cáncer de cabeza y cuello, se aprobó en octubre de 2003. Posteriormente, se aprobó Oncorine, contra el carcinoma nasofaríngeo. Ambos vectores demostraron un efecto sinérgico antitumoral en combinación con radio/quimioterapia, cirugía o hipertermia. Posteriormente, se patentó Advexin, similar a Gendicine®, cuya patente abarca cualquier adenovirus que porte p53 bajo el control de cualquier promotor.

Otro gen supresor tumoral frecuentemente mutado en cáncer, y por lo tanto candidato para la terapia génica, es el del retinoblastoma (Rb), que desempeña un importante papel en el control de la proliferación celular. Estudios preclínicos en carcinoma escamocelular oral

con adenovirus que portan la copia silvestre del gen Rb (Ad-RB110) demostraron la inhibición del crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*.

Sin embargo, estudios realizados con un mutante de este gen, truncado en la región N-terminal (RB94), reportan mayor actividad antitumoral y supresión del crecimiento tumoral en varios tumores, incluido el cáncer de vejiga. Esta terapia activó mecanismos antitumorales como la erosión de los telómeros, la crisis cromosómica⁴², y la apoptosis independiente de activación de caspasas y de fragmentación del ADN. Dado que esta terapia no afecta a las células normales, se han ensayado sistemas virales y no virales para administrar de manera sistémica el mutante Rb94. Millikan et al. están evaluando la expresión de un plásmido que porta el gen RB94 (SGT-94), encapsulado en liposomas en tumores sólidos Rb negativos, para demostrar que transfecta específicamente células tumorales, ocasiona muerte celular e incrementa la respuesta antitumoral de la quimio-radiación.

Otros mecanismos indispensables para mantener la homeostasis celular en los tejidos sanos son la apoptosis (muerte celular programada) y la autofagia (muerte celular programada de tipo II). Alteraciones en la expresión de las proteínas que controlan estos procesos favorecen el desarrollo tumoral y se asocian con el desarrollo de resistencia a las terapias tradicionales. Se puede inducir la muerte celular por apoptosis y sensibilizar a las células tumorales frente a los tratamientos tradicionales utilizando como diana proteínas de la familia Bcl-2 (Bcl-x[S], Bcl-x[AK], Bik/Nbk y Bax) o ligandos de muerte relacionados con el factor de necrosis tumoral (CD95L/FasL, factor de necrosis tumoral α y TRAIL)⁴⁵; Igualmente, se puede inducir la autofagia mediante el restablecimiento de la expresión de XAF1 (*XIAP-associated factor-1*) con Adeno-XAF1 en células de cáncer gástrico. Cuando se combina esta terapia con TRAIL (Adeno-XIAFI/TRAIL), se observa un efecto sinérgico que resulta en la muerte por apoptosis.

Terapia génica suicida

La terapia génica suicida incrementa la susceptibilidad del tumor a la quimioterapia mediante la expresión de un gen suicida que codifica una enzima capaz de catalizar la conversión de un profármaco no tóxico en un metabolito tóxico potente y de corta duración con

capacidad para difundir desde la célula tumoral en la que se produce y eliminar las células tumorales que la rodean (efecto *bystander*) tras la administración del profármaco, sin entrar en la circulación sistémica ni causar efectos secundarios.

Los sistemas suicidas (enzima/profármaco) más utilizados son: el gen de la timidina-cinasa del virus *Herpes simplex* (HSV-tk) (gen suicida), y como profármaco, el ganciclovir (GCV), cuyo producto metabólico tóxico es el deoxi-timidina trifosfato, un análogo de la purina que inhibe la ADN polimerasa e induce apoptosis como resultado del arresto del ciclo celular, y el gen de la citosina desaminasa (CD) de *Escherichia coli* (gen suicida), y 5-fluorocitocina (5-FC) (profármaco), cuyo metabolito tóxico es el 5-fluorouracilo. Se han desarrollado nuevos sistemas suicidas como el basado en el gen del citocromo P450 (gen suicida) y ciclofosfamida o isofosfamida como profármacos cuya actividad antitumoral se potencializa con la transferencia del gen del citocromo P450.

Numerosos ensayos preclínicos para el tratamiento de glioma, cáncer de vejiga, colon, gástrico y pulmón, utilizando el sistema HSV-tk-GCV han arrojado resultados prometedores para aplicarlos a la clínica. En glioma de alto grado operable, se incrementó significativamente la supervivencia, y debido a que la citotoxicidad de este tratamiento en células normales es muy baja, se ha sugerido su posible utilización como tratamiento primario o adyuvante.

Puesto que el cáncer es el resultado de múltiples alteraciones genéticas, el desarrollo de terapias génicas que puedan utilizarse simultáneamente con otras es de gran importancia. Estudios con xenoinjertos de glioma humano en ratas permitieron demostrar que la terapia génica suicida en combinación con la terapia por compensación de mutaciones tiene mayor efecto antitumoral. El tratamiento simultáneo de HSV-tk/GCV y AdCMVp53 arrojó resultados similares a los obtenidos con la terapia suicida sola, utilizando únicamente la mitad de la dosis de GCV.

Lisis de células tumorales usando adenovirus de replicación selectiva (oncólisis viral)

Los adenovirus son seguros, fáciles de manipular genéticamente y poseen ciclo de vida lítico, por lo cual, se han desarrollado variantes virales incapaces de replicarse en células normales

pero capaces de infectar y lisar efectivamente células tumorales. Una vez infectada la célula tumoral, el virus lítico se replica en su interior hasta que la lisa para liberar nuevas partículas virales que infectan las células tumorales vecinas, perpetuando los ciclos de infección, replicación y lisis mientras existan células tumorales que soporten la infección. Estos adenovirus actúan como un agente biológico antitumoral más que como vehículo para administrar genes terapéuticos, sin embargo, su efecto puede mejorarse al insertar genes de citocinas o enzimas.

Con el fin de dirigir su actividad oncolítica, se desarrollaron los adenovirus de replicación selectiva, mediante la depleción de funciones virales no necesarias en células tumorales y la substitución de promotores virales por promotores selectivos del tumor como la alfa-fetoproteína, el antígeno prostático específico, la kallikreína, la mucina I y la osteocalcina, entre otros.

El primer virus de replicación selectiva utilizado en ensayos clínicos aleatorios fue el ONYX-015, que permite la replicación y lisis de células tumorales deficientes en p53. Este vector demostró un nivel de eficacia satisfactorio en modelos preclínicos contra xenoinjertos de carcinoma de ovario humano deficiente de p53. Sin embargo, a pesar de su seguridad, su aplicación en un estudio clínico en mujeres con cáncer de ovario recurrente y refractario al tratamiento no mostró evidencia clara de respuesta clínica o radiológica en ningún paciente.

En un estudio en fase II, tras haberse demostrado una modesta actividad antitumoral con el tratamiento oncolítico en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, se observó que cuando las pacientes recibieron el tratamiento oncolítico combinado con quimioterapia (cisplatino y 5-fluorouracilo), tuvieron una respuesta completa sin progresión a los 6 meses de seguimiento, mientras que todos los tratados únicamente con quimioterapia, progresaron. Adicionalmente, un ensayo aleatorio de fase III, en el que se utilizó el adenovirus H101 en 160 pacientes con cáncer de cabeza y cuello o esófago, demostró que el tratamiento combinado con quimioterapia (cisplatino o adriamicina combinados con 5-fluorouracilo) duplica la respuesta y es bien tolerado.

La oncolisis viral puede combinarse con otras terapias génicas. El adenovirus oncolítico que porta E1A bajo el control del promotor de hTERT, y el gen suicida CD bajo el control del promotor del CMV (Ad.hTERT-E1A/CMV-CD) se replican selectivamente en células tumorales humanas e incrementan el efecto letal sobre células tumorales⁶⁷.

También se pueden diseñar virus que complementen su actividad oncolítica con la enzimática. El virus oncolítico (Ad5/3-Delta24-FCUI) es una quimera (Ad5/3) en la cual se reemplaza la fibra Knob del serotipo 5 por la del serotipo 3 para mejorar la eficiencia de transfección de los virus con cápside silvestre. Adicionalmente, tiene una deleción de 24-bp (Ad5/3-Δ24) en la región constante del gen E1A que restringe su expresión a las células tumorales deficientes en Rb, y porta el gen FCUI (Ad5/3-Delta24-FCUI) que codifica una enzima con doble actividad catalítica: metaboliza la 5-Fluorocitosina, en 5-fluorouracilo y monofosfato de 5-fluorouridina. Un estudio preclínico en carcinoma escamoso de cabeza y cuello mórdo demostró el efecto antitumoral sinérgico cuando se administró el Ad5/3-Delta24FCUI con 5-Fluorocitosina en comparación con los tratados sin el profármaco.

Terapia génica inmunopotenciadora

Dado que las células tumorales son poco inmunogénicas, y debido a que durante su desarrollo el cáncer no causa inflamación ni daño tisular (señales de peligro), no se activa una respuesta inmune efectiva que controle su crecimiento. La terapia génica inmunopotenciadora o vacunación genética en cáncer se ha desarrollado con base en la inducción de una inmunización activa que module los componentes celulares del sistema inmune e incremente su capacidad para reconocer y rechazar los antígenos tumorales. Esta estrategia solo es posible en tumores que expresen antígenos tumorales específicos.

Numerosos ensayos clínicos se han centrado en la introducción de genes de citocinas estimuladoras como interleucina (IL)-2, IL-12 o interferón. Modelos de hepatocarcinoma en ratas tratadas con AdCMV-IL-12 demostraron una inhibición dosis-dependiente del crecimiento tumoral, y en modelos mórdo, se demostró que la cantidad de citocinas expresadas *de novo* en el tumor es importante, puesto que la regresión es mayor cuando el tratamiento se realiza con adenovirus que codifican la IL-2 bajo el control de un promotor

fuerte (citomegalovirus) que cuando se realiza con adenovirus que la codifican bajo el control de un promotor débil como el del Rous Sarcoma Virus.

Las múltiples alteraciones que pueden estar presentes en un tumor dificultan la escogencia de un blanco molecular único para el tratamiento del cáncer. La posibilidad de transferir varios genes para estimular diferentes componentes de la inmunidad y ejercer un efecto aditivo se demostró en un modelo de mieloma múltiple in vitro, donde la transferencia de Ad-p53/GM-CSF/B7-1 indujo apoptosis, proliferación de linfocitos y citotoxicidad específica contra células tumorales. Adicionalmente, células del sistema inmune pueden modificarse para optimizar los protocolos de inmunopotenciación. Las más utilizadas son: presentadoras de antígeno y linfocitos infiltrantes de tumor (NK o LT citotóxicos específicos para antígenos tumorales).

Terapia antiangiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes como consecuencia del desbalance en la concentración de factores anti y proangiogénesis por parte de células endoteliales, monocitos, células de músculo liso y plaquetas.

La angiogénesis, común a los tumores sólidos, es fundamental para la vascularización y el desarrollo del microambiente favorable que garantiza la supervivencia y progresión tumoral, y el desarrollo de metástasis⁷⁵. Su inducción requiere factores de crecimiento (factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, factor de crecimiento derivado de plaquetas), citocinas, (IL-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral α) proteínas de la matriz extracelular (colágeno, endostatina, e integrinas) y enzimas proteolíticas (catepsina, activador del plasminógeno tipo uroquinasa, y gelatinasas A y B), cuya expresión desequilibrada favorece la formación de vasos sanguíneos que irrigan el tumor. Un tumor incapaz de inducir la angiogénesis permanece en estado latente, por lo cual, una terapia antiangiogénesis conducirá a la muerte de las células tumorales al impedir su irrigación sanguínea.

Numerosos ensayos clínicos han demostrado que la endostatina es el inhibidor endógeno de la angiogénesis con mayor espectro antitumoral y menor toxicidad, por lo cual se aprobó su uso para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, no ha tenido mucha aplicación clínica por la dificultad para producirla a gran escala y por su inestabilidad *in vitro*. Se han desarrollado metodologías que permiten producir y purificar la endostatina humana recombinante mediante la infección de células Ad293 con el vector adenoviral Ad-rhEndo.

Esta proteína es más efectiva y estable que la obtenida a partir de levaduras, y su administración no genera resistencia en modelos animales ni en humanos⁷⁸. Diferentes vectores que portan el gen de la endostatina han demostrado actividad antitumoral: el vector E10A incrementó significativamente el efecto inhibitor del crecimiento tumoral del cisplatino en xenoinjertos de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello⁷⁹, y exhibió un excelente perfil de seguridad dado que cuando se evaluó su toxicidad, producción viral y respuesta antitumoral, se encontró que la inyección intratumoral de 1×10^{12} partículas virales por semana en pacientes con tumores sólidos ejerce un efecto antitumoral moderado y es bien tolerado.

También se han ensayado adenovirus recombinantes deficientes de replicación, que codifican las formas secretadas de endostatina: el rAd, que codifica la endostatina murina, inhibe la formación de vasos sanguíneos, la migración y proliferación de células endoteliales, e induce apoptosis en células del endotelio vascular *in vitro* e *in vivo*; y el Ad-rhE que codifica la endostatina humana, genera una alta expresión de endostatina *in vivo*. Tanto el adenovirus como la proteína son metabolizados en el hígado, y se está llevando a cabo un ensayo clínico de fase I para evaluar la seguridad y eficacia del adenovirus (Ad-rhE) en pacientes con tumores sólidos avanzados.

La inducción de un microambiente antioncogénico que anule el prooncogénico se puede lograr mediante la terapia génica. El vector Ad-HBx-mIL-12 combina la actividad antiangiogénesis e inhibidora de apoptosis de la proteína X del virus de la hepatitis B con la actividad de la IL-12, y en carcinoma hepatocelular, conduce a la acumulación masiva de células inmunes, la apoptosis de células tumorales y la reducción de los vasos sanguíneos angiogénicos.

Terapia génica neoadyuvante para el tratamiento tradicional del cáncer

La terapia génica en combinación con los tratamientos tradicionales (neoadyuvancia) mejora la respuesta clínica de los pacientes. Nokisalmi et al. analizaron la dosis de radiación, la modificación de la cápside viral y 5 diferentes promotores para el transgén con el fin de evaluar los mecanismos que median la sobrerregulación del transgén inducida por la radioterapia, y la respuesta al tratamiento combinado con adenovirus deficientes de replicación y radioterapia, en líneas celulares de cáncer de mama, próstata y pulmón.

Un amplio rango de dosis de radiación incrementa la expresión del transgén independientemente de la línea celular, el transgén, el promotor o la modificación de la cápside viral. La radiación induce una respuesta celular global y mayor producción de ARN y proteínas, incluidos los productos transgénicos del adenovirus⁸⁵.

La terapia génica suicida es un claro ejemplo de tratamiento neoadyuvante para mejorar la eficacia del tratamiento quimioterapéutico. Predina et al. reportaron una terapia génica con el sistema AdV-tk/GCV para el tratamiento neoadyuvante en carcinoma de esófago. La combinación entre cirugía, quimioterapia y AdV-tk/GCV mejora la supervivencia y disminuye la recurrencia de la enfermedad por el efecto citotóxico y el incremento del tráfico de células T-CD8 intratumorales.

En la [tabla 2](#) se muestran algunos ejemplos de ensayos clínicos que han sido desarrollados mediante las diferentes modalidades de terapia génica exclusiva o en combinación con las terapias convencionales.

Inicio

☰ Todos los contenidos

☰ Acerca de la revista

☰ Métricas

						general
Oncólisis viral	Terapia génica con ONYX-015 combinado con cisplatino y fluorouracilo en pacientes con cáncer escamocelular de cabeza y cuello avanzado	Determinar factibilidad y dosis máxima de ONYX-015	Droga: cisplatino Droga: fluorouracilo Biológico: ONYX-015	Patrocinador: National Cancer Institute	Cabeza/cuello Ovario Hígado Páncreas	Fase 1 Suspendido
		Determinar distribución de ONYX-015 en biopsia tumoral y de mucosa normal		Colaborador: Dana-Farber Cancer Institute		
		Determinar respuesta a ONYX-015 solo, o en combinación con cisplatino y fluorouracilo		País: Estados Unidos http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00006106		

Inicio

☰ Todos los contenidos

☰ Acerca de la revista

☰ Métricas

	Terapia génica con CV787, en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente al tratamiento hormonal	Determinar la seguridad, tolerabilidad y dosis máxima de la inyección intravenosa de CG7870	Biológico: CG7870 adenovirus citolítico específico del (PSA) antígeno específico de la próstata	Hum Gene Ther. 2001;12:219–26	Próstata metastásico	Fase 1/2 Completo
		Evaluar tasa y duración de la respuesta, farmacocinética sistémica y respuesta inmune frente al CG7870 en cáncer de próstata resistente a tratamiento hormonal				
Compensación de mutaciones	Terapia génica con rAd-p53	Determinar perfiles de eficacia de la	Droga: rAd-p53 Procedimiento:	Patrocinador: Shnzhen SiBiono GeneTech Co., Ltd. China	Tiroides avanzado (III-IV)	Fase 4 Reclutando

BIBLIOGRAFIA

- Biología molecular fundamentos y aplicaciones carlos beas, Daniel Ortuño 2009
- microbiología medica jawetz, melnick y adelberg
- <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Terapia-genica>
- <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/terapias-geneticas>
-