

TÓPICOS SELECTOS DE BIOMEDICINA

COORDINADORES

SYLVIA PÁZ DÍAZ CAMACHO
ELIAKYM ARÁMBULA MERAZ
VERÓNICA JUDITH PICOS CÁRDENAS
FRANCISCO DELGADO VARGAS
DIANA ZOE GALLARDO DÍAZ



TÓPICOS SELECTOS DE BIOMEDICINA

Tópicos selectos de biomedicina

Sylvia Páz Díaz Camacho, Eliakym Arámbula Meraz,
Verónica Judith Picos Cárdenas, Francisco Delgado Vargas
y Diana Zoeé Gallardo Díaz
(coordinadores)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
MÉXICO, 2015

Primera edición: noviembre de 2015

D.R. © SYLVIA PÁZ DÍAZ CAMACHO, ELIAKYM ARÁMBULA MERAZ,
VERÓNICA JUDITH PICOS CÁRDENAS, FRANCISCO DELGADO VARGAS
Y DIANA ZOEÉ GALLARDO DÍAZ (COORDINADORES)

D.R. © UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
Ángel Flores s/n, colonia Centro, Culiacán, 80000 (Sinaloa)
DIRECCIÓN DE EDITORIAL

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio
sin autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

ISBN: 978-607-737-098-7

Impreso y hecho en México

Índice

Prólogo	11
---------------	----

TENDENCIAS EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Implementación clínica de la farmacogenética en América Latina: aspectos regulatorios, étnicos e implicaciones clínicas. Resultados de la Red RIBEF sobre las poblaciones Iberoamericanas <i>Adrián Llerena</i>	15
--	----

Diagnóstico bioquímico de enfermedades raras <i>José Elías García Ortiz</i>	19
--	----

Subversion of immune function by Brucella <i>Alexia Papadopoulos and Jean-Pierre Gorvel</i>	23
--	----

Trayectoria y alcances científicos en biomedicina molecular <i>Guzmán Sánchez Schmitz</i>	33
--	----

GENÉTICA CLÍNICA Y MOLECULAR

Aplicaciones de los microarreglos en la genética clínica <i>Carlos Córdova Fletes</i>	41
--	----

Alcances y perspectivas de la genética forense <i>Héctor Rangel Villalobos</i>	47
---	----

Daño al ADN ocasionado por plaguicidas <i>Carmen Martínez Valenzuela, Stefan M. Waliszewski, Luis Daniel Ortega Martínez, Carlos L. Calderón Vázquez, Eliakym Arámbula Meraz, Cecilia Romero Urías y José Huichapan Martínez</i>	55
---	----

Importancia del genoma mitocondrial en la salud <i>Eliakym Arámbula Meraz, Fred Luque Ortega, Gabriel López López, Elsa Maribel Aguilar Medina y Verónica J. Picos Cárdenas</i>	65
--	----

HEMATOLOGÍA Y ONCOGENÉTICA

Cáncer hereditario. Experiencias en Cuba <i>Martha Sonia Robaina Castellanos</i>	73
---	----

Molecular cytogenetics in hematological malignancies <i>Anna Jauch</i>	85
---	----

INMUNOLOGÍA MOLECULAR

TH17 en enfermedades autoinmunes e infecciosas <i>José Francisco Zambrano-Zaragoza</i>	93
---	----

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en autoinmunidad <i>José Francisco Muñoz-Valle y Ulises de la Cruz-Mosso</i>	97
---	----

Dolor artrítico: causas, mecanismos y oportunidades terapéuticas <i>Martha Ramírez Rosas, Enriqueta Munoz Islas y Juan Miguel Jiménez Andrade</i>	105
--	-----

INFECTOLOGÍA MOLECULAR

Ómica de parásitos helmintos <i>Juan Pedro Lacleste, Julio César Carrero y Raúl J. Bobes</i>	119
---	-----

Potencial zoonótico de <i>Giardia intestinalis</i> en México <i>Martha Ponce Macotela, Yadira Rufino González y Mario Noé Martínez Gordillo</i>	123
--	-----

Genómica y biología molecular en el estudio de patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> enteropatógenas emergentes <i>Junaid Iqbal, Chengxian Zhang, Aamer Imdad, Niharika Malviya, Mónica Arias, N. Tatiana Sanchez, Ana E. Farfán García y Óscar G. Gómez-Duarte</i>	131
La resistencia a antimicrobianos en la era genómica <i>María Elena Báez Flores, Jessica Victoria Hernández Peinado, Bruno Gómez Gil, María del Carmen de la Cruz Otero, Julisa Enciso Ibarra y Ramón Pacheco Arjona</i>	145
Cross-immunoreactivity among hepatitis C virus hypervariable region 1 variants <i>Gilberto Vaughan</i>	155

Prólogo

La biomedicina investiga los mecanismos fisiopatológicos, epidemiológicos, moleculares, bioquímicos, celulares y genéticos de las enfermedades humanas. En la biomedicina molecular se aprovechan los grandes avances científicos y tecnológicos que proveen el conocimiento y técnicas moleculares y ómicas que permiten abordar los aspectos antes mencionados desde el origen mismo de las moléculas hasta las estructuras y los procesos. El desarrollo de la biomedicina y la biomedicina molecular requiere de la interacción multidisciplinaria de investigadores que aborden aspectos básicos y aplicados de las ciencias de la vida, de clínicos profesionales de la salud, docentes y estudiantes que de manera integral, aborden y resuelvan problemas específicos en este ámbito. Las aportaciones en esta área son de gran valor para nuestra sociedad ya que impulsan el desarrollo de reactivos biológicos, fármacos, vacunas y permiten el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades; con el desarrollo de la biomedicina se arriba a la medicina personalizada, a medicamentos dirigidos a blancos terapéuticos específicos que minimizan los efectos secundarios, a estrategias de fomento a la salud basadas en la prevención sustentada en el genoma del individuo, entre otros aspectos.

Este libro conjunta trabajos de investigación y la visión de investigadores, de Europa y América, que están a la vanguardia en biomedicina molecular. En particular se consideraron cuatro áreas de investigación: Genética Clínica y Molecular, Hematología y Oncogenética, Inmunología Molecular e Infectología Molecular.

La información aquí vertida permitirá a los lectores tener una visión del estado del arte en la biomedicina. Asimismo, les proporcionará bases para el desarrollo de proyectos futuros que contribuirán a la resolución de los graves problemas de salud que actualmente afectan a la población de nuestro planeta.



Tendencias en investigación biomédica

Tópicos selectos de biomedicina

Implementación clínica de la farmacogenética en América Latina: aspectos regulatorios, étnicos e implicaciones clínicas. Resultados de la Red RIBEF sobre las poblaciones Iberoamericanas

ADRIÁN LLERENA

CICAB Centro de Investigación Clínica Area de Salud Badajoz SES-SCReN ISCIII. Universidad de Extremadura. Red RIBEF. *PGWP-European Medicines Agency.

La explosión de la Medicina Personalizada (MP) se refleja a nivel global con implicaciones en las Agencias Reguladoras «Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América» (FDA) y «Agencia de Medicinas Europeas» (EMA). En análisis recientes del Pharmacogenomics Working Party de la EMA, se ha identificado un biomarcador en el 32 % de los medicamentos evaluados por procedimientos de registro centralizado. Aunque el concepto de personalización de la medicina ha existido siempre en la práctica médica en base a la información clínica, en la actualidad, el estudio genómico del paciente ha significado un avance definitivo. Como barreras en uso clínico destaca la necesidad de su implementación a nivel de investigación clínica (Peñas-Lledó & Llerena 2014). Otro factor determinante es la variabilidad étnica de las poblaciones, por las diferencias en las frecuencias de polimorfismos relevantes, hábitos, estilos de vida, etc. Este aspecto ha sido considerado por la EMA y la FDA a nivel regulatorio y es el objetivo principal de iniciativas de la Red Iberoamericana de Farmacogenética (www.ribef.com). La red estudia la variabilidad genética de las poblaciones iberoamericanas y su impacto en salud, y está compuesta por 40 grupos de investigación de Iberoamérica. En la actualidad, el Consorcio Iberoamericano de Farmacogenética Poblacional (CEIBA) de la Red Iberoamericana de Farmacogenética y Farmacogenómica (RIBEF) ha concluido el mayor estudio en farmacogenética de poblaciones con el análisis de 5485 voluntarios sanos de toda América Latina, España y Portugal (Llerena *et al.*, 2014).

La implementación de MP se justifica en problemas de salud relevantes, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, enfermedades cardiovasculares, infecciosas o salud mental (Peñas-Lledo & Llerena 2013), donde se puede destacar su aplicación a uno de los mayores problemas sanitarios de la actualidad, el suicidio (segunda causa de muerte en jóvenes, OMS 2014). En este sentido se ha demostrado la potencial utilización de la MP para la prevención del suicidio, específicamente factores farmacogenéticos (multiplicación del *CYP2D6* relacionada con el metabolismo ultrarrápidos —MUs—) se relacionan con la severidad del intento suicida (Peñas-Lledó *et al.*, 2012) en población general, incluyendo poblaciones con trastornos mentales como los Trastornos del Comportamiento Alimentario (Peñas-Lledó *et al.*, 2011). Resultados que apoyan esta relación son los que se han descrito en una cohorte de pacientes depresivos evaluados en México, donde se ha visto que aquellos que abandonan la medicación antidepressiva son los evaluados como *CYP2D6*MUs (Peñas-Lledó *et al.*, 2013). Recientemente se ha demostrado por primera vez en una muestra de intentos suicidas del sur de Francia el efecto combinado de los polimorfismos de los CYPs

Tendencias en investigación biomédica

(2D6-2C19) sobre el suicidio y las posibles causas de esta asociación (Peñas-Lledó et al., 2014). Por tanto, la caracterización de los CYP2D6 MUs podría ser de utilidad para mejorar el tratamiento de la depresión e intentar prevenir el suicidio, y es un ejemplo de potencial uso de la MP.

REFERENCIAS

- 1: Llerena A, Naranjo ME, Rodrigues-Soares F, Penas-Lledó EM, Fariñas H, Tarazona-Santos E. Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014 Nov;10(11):1569-83. doi: 10.1517/17425255.2014.964204. PubMed PMID: 25316321.
- 2: Peñas-Lledó E, Guillaume S, Naranjo ME, Delgado A, Jaussent I, Blasco-Fontecilla H, Courtet P, Llerena A. A combined high CYP2D6-CYP2C19 metabolic capacity is associated with the severity of suicide attempt as measured by objective circumstances. *Pharmacogenomics J.* 2014 Aug 12. doi:10.1038/tpj.2014.42. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25113522.
- 3: Peñas-Lledó EM, Llerena A. CYP2D6 genetic polymorphism and psychiatry patients' hospitalization period. *Biomark Med.* 2013 Dec;7(6):915-6. doi: 10.2217/bmm.13.108. PubMed PMID: 24266825.
- 4: Peñas-Lledó EM, Llerena A. CYP2D6 variation, behaviour and psychopathology: implications for pharmacogenomics-guided clinical trials. *Br J Clin Pharmacol.* 2014 Apr;77(4):673-83. doi: 10.1111/bcp.12227. PubMed PMID: 24033670; PubMed Central PMCID: PMC3971983.
- 5: De Andrés F, Sosa-Macías M, Lazalde-Ramos BP, Naranjo ME, Tarazona-Santos E, Llerena A; CEIBA. FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics RIBEFa. Evaluation of drug-metabolizing enzyme hydroxylation phenotypes in Hispanic populations: the CEIBA cocktail. *Drug Metabol Drug Interact.* 2013;28(3):135-46. doi: 10.1515/dmdi-2013-0020. Review. PubMed PMID:23787463.
- 6: Peñas-Lledó EM, Naranjo ME, Llerena A. Impact of cytochrome P450 genes on suicide attempt and risk. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2013; Dec;263(8):703-4. doi: 10.1007/s00406-013-0402-7. Epub 2013 Mar 16. PubMed PMID: 23504002.
- 7: Llerena A. Clinical pharmacology of drug metabolism and drug interactions: clinical, interethnic and regulatory aspects. *Drug Metabol Drug Interact.* 2013;28(1):1-3. doi: 10.1515/dmdi-2013-0010. PubMed PMID: 23449520.
- 8: Peñas-Lledó EM, Trejo HD, Dorado P, Ortega A, Jung H, Alonso E, Naranjo ME, López-López M, Llerena A. CYP2D6 ultrarapid metabolism and early dropout from fluoxetine or amitriptyline monotherapy treatment in major depressive patients. *Mol Psychiatry.* 2013 Jan;18(1):8-9. doi: 10.1038/mp.2012.91. Epub 2012 Jun 26. PubMed PMID: 22733128.
- 9: Peñas-Lledó EM, Blasco-Fontecilla H, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C, Baca-García E, Llerena A. CYP2D6 and the severity of suicide attempts. *Pharmacogenomics.* 2012 Jan;13(2):179-84. doi: 10.2217/pgs.11.146. Epub 2011 Dec 5. PubMed PMID: 22141351.
- 10: Peñas-Lledó EM, Dorado P, Agüera Z, Gratacós M, Estivill X, Fernández-Aranda F, Llerena A. High risk of lifetime history of suicide attempts among CYP2D6 ultrarapid metabolizers with eating disorder.

Tópicos selectos de biomedicina

ders. *Mol Psychiatry*. 2011; Jul;16(7):691-2. doi: 10.1038/mp.2011.5. Epub 2011 Feb 15. PubMed PMID: 21321564.

- 11: Peñas-Lledó EM, Dorado P, Agüera Z, Gratacós M, Estivill X, Fernández-Aranda F, Llerena A. CYP2D6 polymorphism in patients with eating disorders. *Pharmacogenomics J*. 2012 Apr;12(2):173-5. doi: 10.1038/tpj.2010.78. Epub 2010 Sep 28. PubMed PMID: 20877302.

Tópicos selectos de biomedicina

Diagnóstico bioquímico de enfermedades raras

JOSÉ ELÍAS GARCÍA ORTIZ

División de Genética, CIBO-IMSS. Guadalajara, Jalisco.

ENFERMEDADES RARAS

Las enfermedades raras (ER), poco frecuentes o de baja prevalencia, se definen como cualquier enfermedad con una frecuencia menor a 1 por cada 2000 individuos en la Unión Europea o menos de 1 por cada 2500 personas en Estados Unidos; de tal forma que habrá aproximadamente 500 pacientes por cada enfermedad rara en una población de un millón de habitantes. En México, aunque se desconocen las estadísticas reales, se infiere que existen al menos 6 millones de personas con alguna enfermedad de baja prevalencia.

Se estima además que existen de 7000 a 10 000 enfermedades raras y como grupo, constituyen un porcentaje importante de todas las enfermedades a nivel global, involucrando prácticamente todas las especialidades médicas. Por su rareza, el reto en enfermedades raras recae en el diagnóstico difícil, la falta de tratamiento efectivo y el poco interés que hay por hacer investigación en ellas y en el desarrollo de tratamientos específicos. Aproximadamente, cuatro de cada cinco ER tienen una causa genética. En más de la mitad de las ER, las manifestaciones clínicas aparecen al nacimiento o la niñez. Además, la mayoría de ellas se caracterizan por ser graves, crónicas, degenerativas y potencialmente letales; por ende, son incapacitantes, disminuyen la calidad de vida y limitan la autonomía de los individuos afectados.

Debido a la baja prevalencia, las ER tienen el inconveniente de que son poco conocidas por la mayoría de los médicos, lo que dificulta el diagnóstico oportuno; adicionalmente, muchas de ellas no tienen tratamiento específico y en el ámbito científico, ha existido poco interés para hacer investigación en estas enfermedades. Estudios realizados por la Organización Europea para las Enfermedades Raras (EURORDIS) han establecido que 25 % de los pacientes con una ER esperan de 5 a 30 años para conocer el diagnóstico definitivo y 40 % de ellos en una primera instancia tuvieron un diagnóstico equivocado. De acuerdo con fuentes del Departamento de Salud y Servicios Públicos de los Estados Unidos, los pacientes con una enfermedad rara puede tardar menos de un año en el 50% de los casos, de uno a cinco años en el 35% de los casos y más de 15 años en el 15 %. La falta de difusión de las enfermedades raras acentúa el poco interés que la comunidad médica tiene hacia ellas, destacándose también que los pocos recursos que se derivan a ellas, no mejora la atención de las mismas. Un estudio realizado en Reino Unido que evaluó el tiempo de espera para el diagnóstico de una enfermedad raras reveló que hasta un 20 % de los pacientes esperó de 5 a 20 años para tener un diagnóstico y que pudo ver más de 6 médicos para llegar al diagnóstico definitivo. Finalmente, se puede decir que las enfermedades son las raras pero no los pacientes y además, cuando una familia tiene un miembro afectado, toda la familia se ve involucrada de una forma u otra.

Tendencias en investigación biomédica

Si se aborda el ámbito personal de una persona que padece una ER, es importante tomar en cuenta que las enfermedades son raras pero los pacientes de enfermedades raras son muchos, por lo que ¡no es raro tener una enfermedad rara! Ni es tampoco raro «estar afectado» por una enfermedad rara, cuando toda la familia de un paciente está ciertamente afectada en un sentido o en otro. Para las personas con ER, esta rareza tiene consecuencias adversas, desde un punto de vista médico, como ya se mencionó líneas arriba, así como también social, ya que se disminuye la esperanza de vida y se afecta en forma importante la calidad de vida del paciente y su familia; se generan gastos económicos muchas veces excesivos para la familia; y se pierden oportunidades sociales como la educación, el acceso al trabajo, las diversiones, etc.

Para paliar en alguna forma esta situación es importante tomar conciencia al respecto de las enfermedades raras y promover el conocimiento de las ER; aumentar las actividades de investigación como un medio para mejorar el conocimiento y las oportunidades de tratamiento; proporcionar un cuidado de la salud adecuado y servicios sociales a los afectados; y mejora y armonizar el acceso a todos los afectados con ER.

Desde el año 2008, el último día de febrero se celebra el Día de las Enfermedades Raras, para hacer más visibles las ER en la sociedad y ayudar, en alguna forma, a garantizar la igualdad en el reconocimiento y el acceso a tratamiento de los pacientes. La primera celebración fue el 29 de Febrero de 2008 (¡el día más raro del año!) en Europa y los Estados Unidos particularmente. Desde 2009, en México se celebra ese día con diversas actividades en las que cada vez, son más las fundaciones y organizaciones civiles y de pacientes, las que se ven involucradas.

ENFERMEDADES LISOSOMALES

Las enfermedades lisosomales (EL), son un grupo particular de Errores Innatos del Metabolismo (EIM) en los que la vía metabólica involucrada compromete, tradicionalmente, una enzima de tipo hidrolasa o el co-factor de esta enzima cuyo nicho natural es el lisosoma y condiciona la acumulación progresiva y/o excreción anormal de metabolitos intermedios de moléculas complejas. En la actualidad se conocen más de 50 enfermedades lisosomales, la prevalencia global estimada es de 1 en 5,000 a 1 en 7,000 recién nacidos vivos. En general, se puede decir que las enfermedades lisosomales son padecimientos progresivos, debilitantes y frecuentemente fatales; poco más de la mitad de ellas cursan con un deterioro progresivo e irreversible del sistema nervioso central. El diagnóstico temprano es esencial sobre todo porque algunas EL pueden ser tratadas al reemplazar la enzima deficiente, lo que puede disminuir, detener o revertir las manifestaciones clínicas y mejorar la calidad de vida del paciente.

Aunque el diagnóstico generalmente es clínico, se pueden utilizar herramientas de laboratorio para confirmarlas: pruebas bioquímicas de tamizaje (gota seca en papel filtro) o confirmatorias (actividad enzimática leucocitaria o estudio molecular del gen específico); en algunas enfermedades se puede medir también el sustrato acumulado (en orina, suero o plasma). Los métodos de medición cuantitativa de la actividad de enzimas lisosomales se puede hacer utilizando sustratos radioactivos, cromogénicos (unidos a -p-nitrofenol o -p-nitrocatecol) o fluorogénicos (unidos a -4-metil-ubeliferil).

En el laboratorio de diagnóstico bioquímico de enfermedades lisosomales de la División de Genética, del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS) se

Tópicos selectos de biomedicina

realiza el diagnóstico bioquímico de enfermedades lisosomales desde hace poco más de 30 años en individuos estudiados en nuestro laboratorio en más de 20 diferentes actividades enzimáticas en leucocitos y desde el año 2013 es centro nacional de referencia para el estudio confirmatorio de pacientes que reciben tratamientos de remplazo enzimático en el mismo instituto. Se realiza también seguimiento de pacientes que reciben terapia al monitorear biomarcadores y se cuenta con líneas de investigación en origen ancestral de mutaciones más frecuentes en el gen *GBA1*; determinación de frecuencias de polimorfismos en el gen *CHIT1* en población mestiza y en poblaciones amerindias; identificación de enfermedades lisosomales en casos prenatales con *hydrops fetalis*; determinación de frecuencia de pseudodeficiencias en aril-sulfatasa A y alfa-glucosidasa en población general, entre otras.

RETOS EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES LISOSOMALES

A pesar del avance en el diagnóstico y tratamiento de las EL en México, de la consolidación de grupos de expertos a nivel institucional e inter-institucional, de la creación de Consensos Nacionales y la publicación de Guías de Práctica Clínica y de la sensibilización de la sociedad hacia las enfermedades raras, siguen habiendo retos no atendidos, algunos de ellos son: la homogeneización de la atención a pacientes con enfermedades lisosomales (diagnóstico, análisis, mediciones e indicadores apropiados), la falta de indicadores nacionales en estadística y datos epidemiológicos reales de estas enfermedades; la inclusión de datos en registros nacionales e internacionales, la consolidación de centros nacionales de referencia, la falta de leyes que garanticen el acceso universal a tratamiento y la ausencia de estudios de farmaco-economía y regulación de nuevos tratamientos. En esta área debe mencionarse también la necesidad de que los centros nacionales de referencia, aparte de ofrecer el diagnóstico clínico y confirmatorio, faciliten el tamizaje de poblaciones en general o de grupos de riesgo; oferten el diagnóstico confirmatorio (bioquímico y molecular); favorezcan el seguimiento de pacientes y sus tratamientos y permitan el entrenamiento de cuidadores de la salud; deben ser también centros de enlace entre instituciones de salud, asociaciones de pacientes e industria farmacéutica, centros desarrolladores de proyectos de investigación y semilleros de publicaciones científicas, además de certificar los procesos de diagnóstico entre otras actividades. Para ello se requiere trabajar en equipo, con desinterés, integridad, objetividad, rendición de cuentas, apertura, honestidad y liderazgo.

REFERENCIAS

- Da Silva-José TD, Juárez-Rendón KJ, Juárez-Osuna JA, Porras-Dorantes A, Valladares-Salgado A, Cruz M, Gonzalez-Ibarra M, Soto AG, Magaña-Torres MT, Sandoval-Ramírez L, García-Ortiz JE. Dup-24 bp in the *CHIT1* gene in six Mexican Amerindian Populations. *JIMD Rep.* 2015;23:123-7.
- Futterman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004 Jul;5(7):554-65.
- <http://www.hon.ch/HONselect/RareDiseases>, 2015.
- <http://www.eurordis.org/>, 2015.

Tendencias en investigación biomédica

- Juárez-Rendón KJ, Lara-Aguilar RA, García-Ortiz JE. 24-bp duplication on CHIT1 gene in Mexican population. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2012 Jul-Aug;50(4):375-7.
- Metha A, Winchester B. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide.* 2013. Wiley-Blackwel. ISBN: 978-0-470-67087-3.
- Staretz-Chacham O, Lang TC, LaMarca ME, Krasnewich D, Sidransky E. Lysosomal storage disorders in the newborn. *Pediatrics.* 2009 Apr;123(4):1191-207.
- Wraith JE. *Lysosomal disorders.* *Semin Neonatol.* 2002 Feb;7(1):75-83.
- Wraith JE, Clarke LA, Beck M, Kolodny EH, Pastores GM, Muenzer J, Rapoport DM, Berger KI, Swiedler SJ, Kakkis ED, Braakman T, Chadbourne E, Walton-Bowen K, Cox GF. *Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase).* *J Pediatr.* 2004 May;144(5):581-8.

Subversion of immune function by *Brucella*

ALEXIA PAPADOPOULOS AND JEAN-PIERRE GORVEL*

Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix Marseille Université UM2, Inserm, U1104, CNRS UMR7280, 13288 Marseille, France.

*To whom correspondence should be addressed.

ABSTRACT

Brucella is a facultative intracellular Gram-negative pathogen for humans and animals. The origin of its name comes from the biologist David Bruce who discovered it in 1887 on the island of Malta. It has been isolated from the spleen of soldiers who died from a disease called Malta fever at that time and renamed brucellosis [2]. In this review will concentrate on some of the mechanisms used by *Brucella* to subvert immune responses.

1. BRUCELLA GENUS

The *Brucella* genus belongs to the α -2 proteobacteria subdivision and includes 10 species originally named according to their primary host [1]: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *inopinata* *B.*, *B. pinnipidialis*, *B. microti* and *B. ceti* [1-3]. These different strains are able to infect a wider spectrum of species than their original host. Among these strains, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* and *B. canis* can infect humans.

2. BRUCELLOSIS IN ANIMALS

Brucella can affect both aquatic animals and terrestrial animals and especially cattle. The sensitivity of animals to *Brucella* and the effectiveness of the dispersion of the disease between individuals is causing major economic problems.

Pathogen transmission between animals may be due to direct contact with body tissues or fluids from another infected animal (mating, pregnancy, lactation). *Brucella* is a bacterium that can survive in the environment for long periods of time. Thus, the animals can be infected by consumption of water or food that have been in contact with contaminated fluids (urine, amniotic fluid) as well as by inhalation of infected aerosols (from litters for example) through the ocular and respiratory tract.

Tendencias en investigación biomédica

Once in contact with his host, *Brucella* target mainly genital tract organs such as the placenta and mammary glands in females and the epididymis in males [4, 5]. Therefore, brucellosis manifests itself in most cases by abortions and fertility disorders. *Brucella* can also reach the joints and cause chronic inflammation and arthritis. As animal vaccination is not providing enough satisfactory results, brucellosis remains a major economic issue.

3. BRUCELLOSIS IN HUMANS

Humans can be infected by ingestion of contaminated animal products (such as milk or unpasteurized cheese), inhalation of infected particles by direct contact with body tissues or fluids from animals carrying the bacteria. These last two points mainly concern the staff working with animals such as veterinarians or farmers [6]. However, cases of human transmission to humans is extremely rare, humans are considered not only as accidental hosts but also as a dead end for the bacteria. Each year 500 000 new cases are reported by WHO making brucellosis the most common zoonosis worldwide [7]. Brucellosis remains endemic in some regions of the world and particularly in Central and South America, Africa, Asia or the Middle East.

Brucellosis in humans causes a wide variety of symptoms [2]. Therefore, this disease is often misdiagnosed and confused with flu symptoms. The disease can be divided into three phases in all the affected individuals. First, an incubation period before the onset of symptoms, followed by an acute phase in which the bacteria invades the host and spread throughout the body and finally a chronic phase accompanied by extensive damage to various organs, arthritis (in most cases) to more serious diseases such as hepatitis, endocarditis or even neurological affection [6]. Brucellosis treatment requires a combination of antibiotics (doxycycline, rifampin, streptomycin, gentamicin and quinolones) for long periods of time and so far, no vaccine has yet been developed for humans.

4. STRATEGIES FOR SURVIVAL AND PERSISTENCE OF *BRUCELLA*

Brucella is therefore not only able to persist in the host but also to reach a wide variety of organs. This ability is mainly linked to *Brucella* ability to survive in a wide range of cells such as phagocytic cells, placental trophoblasts, epithelial and endothelial cells, microglia, fibroblasts ... Moreover, the absence of significant symptoms during pathology raises many questions about the immune system. It is therefore interesting to understand how *Brucella* escapes the immune system to persist in the host and succeed in developing a chronic disease.

It has been demonstrated that the murine model is a good model for studying this disease. [8] The mouse infection causes a similar phenotype to that seen in humans. It generates either sepsis or massive cytokine production. There are no effects on blood coagulation and recruitment of immune system cells are limited [9].

Discoveries made in mice on bacterial entry, their intracellular trafficking strategies and immune system inhibition will be developed in the next section.

4.1. Intracellular trafficking

Oral mucosa, genital and respiratory tract infections are the major entry sites of *Brucella* in the body [10-12].

As we mentioned in the introduction, the entry of *Brucella* does not generate strong reactions in infected cells. It has been shown that infection by air or intestinal tract is not responsible for histological changes of the lungs or intestines [13, 14]. Input mechanisms in the body are still unknown but it seems that *Brucella* attaches to the epithelial barrier via receptors containing sialic acids and sulfated residues. This adhesion would induce a signaling cascade involved in cytoskeletal rearrangements facilitating bacterial invasion [15, 16]. After crossing the epithelial barrier *Brucella* will enter the bloodstream and be engulfed in particular by phagocytic cells of the infected mucosa.

Understanding the mechanisms of *Brucella* entry into cells is still incomplete but some key points have been identified. The entry into cells require the presence of lipid rafts rich in cholesterol [17-21]. In addition, two receptors have been identified on the surface of macrophages, «Macrophage Scavenger Receptor Class A» (SR-A) which interacts with the lipopolysaccharide (LPS) of *Brucella* [22] and «cellular prion protein» (PrPC) that would bind to the protein Hsp60 chaperone *Brucella*. For PrPC and Hsp60 conflicting results were obtained and the conclusions on this receptor have not been verified [20, 22-24].

When *Brucella* enters the cell, it resides in a vacuole called «*Brucella*-containing vacuole» (BCV). BCV will merge with the early and late endosomes and acquire the markers of these cellular compartments [27, 28]. To escape degradation by the lysosome, *Brucella* will prevent the fusion of BCV with lysosomes.

The cyclic β -glucan 1.2 (C β G) plays a major role in this phenomenon. The C β G is a compound of the envelope of Gram-negative bacteria present in the periplasm, and important for maintaining the stability of the membranes. It interacts with lipid rafts and disrupts their organization allowing the BCV to escape the lysosomal pathway [25, 29, 30]. In addition, *Brucella* has a two-component regulatory system called BvrR / BvrS involved in the homeostasis of the bacterial outer membrane and appears to contribute to the intracellular traffic of BCV [31, 32].

It is interesting to note that the BCV acquires markers for late endosomes / lysosomes like «Lysosomal-associated membrane protein 1» (LAMP1) [25]. The assumption in this regard is inclined to transient interaction between BCV and late endosomes/ lysosomes, necessary for the acidification of the intra vacuolar environment. This acidification step seems indispensable to the establishment of the replicative niche. Indeed, acidification induces activation VirB operon which codes for a type of secretion system 4 (T₄SS) necessary for late maturation BCV [33-36]. This will result in the fusion of the BCV with the endoplasmic reticulum [28, 34, 37, 38]. This step requires the interaction of BCV with ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Site) [39, 40]. Moreover, the BtpA protein of *Brucella* containing a TIR domain called Btp for «*Brucella* TIR-containing protein» (or Tcp for «TIR domain containing-protein») appears to be involved in the reorganization of the rough endoplasmic reticulum by the induction of ER stress called «Unfold Protein Response» (UPR) facilitating endoplasmic reticulum membrane recruitment [41]. At this stage, the bacterium is in a vacuole derived from the endoplasmic reticulum and begins to multiply without risk of degradation by the host system [28, 42]. BCV can then be converted to autophagic vacuole. This transformation will complete its intracellular cycle and promote the dispersion of the bacteria to other cells [27, 43, 44].

Tendencias en investigación biomédica

Brucella has developed effective ways to divert the traffic of its intracellular vacuole and prevent the bactericidal activity of phagocytic cells.

4.2. Controlling activation of the immune system

In addition to preventing its degradation and promote survival in these host cells, *Brucella* is able to control the tripping of a deleterious immune response to the bacteria.

This strategy starts from the recognition of signals associated with pathogens. Indeed, *Brucella* is not efficiently recognized by receptors specific in microorganisms' recognition such as Toll-like receptors (TLRs). TLR4 and TLR5 recognize LPS and flagellin, respectively.

LPS is a bacterial component present at the surface of Gram-negative bacteria. It consists of a stimulatory portion called lipid A which is connected to a core oligosaccharide itself connected (smooth LPS) or not (rough LPS) to an oligosaccharide chain called O-chain. LPS *Brucella* has a unique structure which differs from conventional LPS composition (modification of lipid A and long fatty acid residues chain) [45]. The smooth *Brucella* LPS can be described as a weak stimulator of the immune system. It interacts with TLR4 but does not induce a signaling cascade. Therefore, it inhibits the production of cytokines required for the initiation of the immune response [46]. In addition, it prevents the effect of antibacterial peptides and allows the bacteria to avoid opsonization by complement [47-50]. Rough LPS is more similar to conventional LPS and can therefore be recognized and induce TLR signaling [51].

Flagellin composing the flagella of *Brucella* does not have the core area for its recognition by TLR5 and therefore comparably to LPS, this component is a weak inducer of the inflammatory engaged response by TLR5 [52, 53].

TIR domains of proteins BtpB and BtpA play a role in inhibiting the immune response. These proteins act at different levels of TLR signaling. They block the activation of the «nuclear factor-kappa B» (NF-kB) [54], interact with TLR4 and MyD88 signaling by inducing degradation of some components of the signaling cascade [55-57]. Thus, *Brucella* Btp proteins will also contribute to the control of the production of proinflammatory cytokines [12, 54, 58].

Therefore, it has been shown that during the infection of human monocytes and macrophages, for example the production of «Tumor Necrosis Factor α » (TNF α) is inhibited by *Brucella* [59].

Despite a weak inflammatory response during infection with *Brucella*, a production of interferon γ (IFN γ) is still quantifiable [60, 61]. Stimulation of macrophages with IFN γ will allow to eliminate more effectively *Brucella* [62] and the use of mutant mice for the signaling IFN γ prevents mice survival to *Brucella* infection [63, 64]. This IFN γ dependence implies the need for a Th1 response induced by interleukin 12 (IL12) and IL18 production by antigen presenting cells. It has indeed been shown that IL12 plays an important role in resistance to infection with *Brucella* and in particular to its role in stimulating the production of IFN γ [65-67].

It is possible to imagine that the presence of pro-inflammatory cytokines can be offset by the production of anti-inflammatory cytokines. Indeed, in the case of infection by *Brucella*, induction of IL10 production can be observed. In addition, its inhibition allows more efficient removal of bacteria, a sign of its important role in the survival of *Brucella* [68, 69]. The production of IL10 would limit the bactericidal

Tópicos selectos de biomedicina

activity of macrophages and a study shows that B lymphocytes could be the main source of this cytokine [70, 71].

Brucella is also capable of acting at the level of antigen presentation to hinder the activation of naive T lymphocytes and so the development of an effective immune response.

Brucella LPS is internalized by macrophages and form large complexes with major histocompatibility complex (MHC) class I and II components and lipid rafts, originally structures called «macro-domains». The MHC will be restricted in these areas thus preventing effective presentation of MHC-peptide complexes to naive T lymphocytes [72, 73]. It has been shown that *Brucella* is also capable of decreasing the IFN γ induced-MHCI expression by sequestering MHCI molecules in the Golgi apparatus. Therefore, the disturbance in antigen presentation, trafficking of MHC-peptides as well as cytokine production allows *Brucella* this control the adaptative immune response [74-76].

The lipoproteins of the Omp family («Outer Membrane Protein») are as the name implies the proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria. They also play a role in the immune response to *Brucella*. Omp 19 is capable of inhibiting the expression of MHCII and monocyte antigens processing having received an IFN γ signal [74]. However, Omp 16 and 19 induce a pro-inflammatory response and could be the cause of the production of cytokines [77].

REFERENCES

1. Guzman-Verri, C., *et al.*, *Brucella ceti and brucellosis in cetaceans*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. 2: p. 3.
2. Moreno, E., Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. Front Microbiol, 2014. 5: p. 213.
3. Moreno, E., *et al.*, *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. J Bacteriol, 1990. 172(7): p. 3569-76.
4. Xavier, M.N., *et al.*, Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. J Comp Pathol, 2009. 140(2-3): p. 149-57.
5. Carvalho Neta, A.V., *et al.*, *Pathogenesis of bovine brucellosis*. Vet J, 2010. 184(2): p. 146-55.
6. de Figueiredo, P., *et al.*, Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis: Review of *Brucella*-Host Interactions. Am J Pathol, 2015. 185(6): p. 1505-1517.
7. Pappas, G., *et al.*, *The new global map of human brucellosis*. Lancet Infect Dis, 2006. 6(2): p. 91-9.
8. Grillo, M.J., *et al.*, What have we learned from brucellosis in the mouse model? Vet Res, 2012. 43: p. 29.
9. Barquero-Calvo, E., *et al.*, *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. PLoS One, 2007. 2(7): p. e631.
10. Enright, F.M., *et al.*, Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*. Vet Immunol Immunopathol, 1990. 26(2): p. 171-82.
11. Ackermann, M.R., N.F. Cheville, and B.L. Deyoe, Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. Vet Pathol, 1988. 25(1): p. 28-35.

Tendencias en investigación biomédica

12. Salcedo, S.P., *et al.*, *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog*, 2008. 4(2): p. e21.
13. Mense, M.G., *et al.*, Bacteriologic and histologic features in mice after intranasal inoculation of *Brucella melitensis*. *Am J Vet Res*, 2001. 62(3): p. 398-405.
14. Paixao, T.A., *et al.*, Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infect Immun*, 2009. 77(10): p. 4197-208.
15. Castaneda-Roldan, E.I., *et al.*, Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol*, 2004. 6(5): p. 435-45.
16. Castaneda-Roldan, E.I., *et al.*, Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell Microbiol*, 2006. 8(12): p. 1877-87.
17. Watarai, M., *et al.*, Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice. *Infect Immun*, 2002. 70(9): p. 4818-25.
18. Naroeni, A. and F. Porte, Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun*, 2002. 70(3): p. 1640-4.
19. Watarai, M., *et al.*, Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol*, 2002. 4(6): p. 341-55.
20. Watarai, M., Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains. *Microbes Infect*, 2004. 6(1): p. 93-100.
21. Lee, J.J., *et al.*, Interplay between clathrin and Rab5 controls the early phagocytic trafficking and intracellular survival of *Brucella abortus* within HeLa cells. *J Biol Chem*, 2013. 288(39): p. 28049-57.
22. Kim, S., *et al.*, Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb Pathog*, 2004. 37(1): p. 11-9.
23. Fontes, P., *et al.*, Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with *Brucella suis*. *Infect Immun*, 2005. 73(10): p. 6229-36.
24. von Bargen, K., J.P. Gorvel, and S.P. Salcedo, *Internal affairs: investigating the Brucella intracellular lifestyle*. *FEMS Microbiol Rev*, 2012. 36(3): p. 533-62.
25. Starr, T., *et al.*, *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*, 2008. 9(5): p. 678-94.
26. Celli, J., The changing nature of the *Brucella*-containing vacuole. *Cell Microbiol*, 2015.
27. Pizarro-Cerda, J., *et al.*, *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*, 1998. 66(12): p. 5711-24.
28. Celli, J., *et al.*, *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med*, 2003. 198(4): p. 545-56.
29. Briones, G., *et al.*, *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun*, 2001. 69(7): p. 4528-35.
30. Arellano-Reynoso, B., *et al.*, Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol*, 2005. 6(6): p. 618-25.
31. Sola-Landa, A., *et al.*, A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol*, 1998. 29(1): p. 125-38.

Tópicos selectos de biomedicina

32. Guzman-Verri, C., *et al.*, The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(19): p. 12375-80.
33. Porte, F., J.P. Liautard, and S. Kohler, Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun*, 1999. 67(8): p. 4041-7.
34. Comerci, D.J., *et al.*, Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol*, 2001. 3(3): p. 159-68.
35. Boschioli, M.L., *et al.*, *The Brucella suis virB operon is induced intracellularly in macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(3): p. 1544-9.
36. Sieira, R., *et al.*, Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* virB operon. *Mol Microbiol*, 2004. 54(3): p. 808-22.
37. Pizarro-Cerda, J., E. Moreno, and J.P. Gorvel, *Invasion and intracellular trafficking of Brucella abortus in nonphagocytic cells*. *Microbes Infect*, 2000. 2(7): p. 829-35.
38. Delrue, R.M., *et al.*, Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol*, 2001. 3(7): p. 487-97.
39. Celli, J., S.P. Salcedo, and J.P. Gorvel, *Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(5): p. 1673-8.
40. Fugier, E., *et al.*, The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase Rab 2 are crucial for *Brucella* replication. *PLoS Pathog*, 2009. 5(6): p. e1000487.
41. Smith, J.A., *et al.*, *Brucella* induces an unfolded protein response via TcpB that supports intracellular replication in macrophages. *PLoS Pathog*, 2013. 9(12): p. e1003785.
42. Roop, R.M., 2nd, *et al.*, *Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche*. *Mol Microbiol*, 2004. 52(3): p. 621-30.
43. Pizarro-Cerda, J., *et al.*, Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun*, 1998. 66(5): p. 2387-92.
44. Starr, T., *et al.*, Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe*, 2012. 11(1): p. 33-45.
45. Cardoso, P.G., *et al.*, *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact*, 2006. 5: p. 13.
46. Lapaque, N., *et al.*, Differential inductions of TNF-alpha and IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol*, 2006. 8(3): p. 401-13.
47. Hoffmann, E.M. and J.J. Houle, Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Vet Immunol Immunopathol*, 1983. 5(1): p. 65-76.
48. Martinez de Tejada, G., *et al.*, The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun*, 1995. 63(8): p. 3054-61.
49. Velasco, J., *et al.*, *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect Immun*, 2000. 68(6): p. 3210-8.
50. Lapaque, N., *et al.*, *Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor*. *Curr Opin Microbiol*, 2005. 8(1): p. 60-6.
51. Moreno, E., *et al.*, Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. *J Bacteriol*, 1979. 138(2): p. 361-9.

Tendencias en investigación biomédica

52. Andersen-Nissen, E., *et al.*, *Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(26): p. 9247-52.
53. Terwagne, M., *et al.*, Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of *Brucella*. Cell Microbiol, 2013. 15(6): p. 942-60.
54. Radhakrishnan, G.K., *et al.*, *Brucella* TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP. J Biol Chem, 2009. 284(15): p. 9892-8.
55. Cirl, C., *et al.*, Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. Nat Med, 2008. 14(4): p. 399-406.
56. Sengupta, D., *et al.*, Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. J Immunol, 2010. 184(2): p. 956-64.
57. Chaudhary, A., *et al.*, *The Brucella TIR-like protein TcpB interacts with the death domain of MyD88*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 417(1): p. 299-304.
58. Radhakrishnan, G.K. and G.A. Splitter, *Biochemical and functional analysis of TIR domain containing protein from Brucella melitensis*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. 397(1): p. 59-63.
59. Caron, E., *et al.*, Live *Brucella* spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. Infect Immun, 1994. 62(12): p. 5267-74.
60. Roux, C.M., *et al.*, *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. Cell Microbiol, 2007. 9(7): p. 1851-69.
61. Rolan, H.G. and R.M. Tsolis, Inactivation of the type IV secretion system reduces the Th1 polarization of the immune response to *Brucella abortus* infection. Infect Immun, 2008. 76(7): p. 3207-13.
62. Jiang, X. and C.L. Baldwin, *Effects of cytokines on intracellular growth of Brucella abortus*. Infect Immun, 1993. 61(1): p. 124-34.
63. Ko, J., *et al.*, Virulence criteria for *Brucella abortus* strains as determined by interferon regulatory factor 1-deficient mice. Infect Immun, 2002. 70(12): p. 7004-12.
64. Ko, J., A. Gendron-Fitzpatrick, and G.A. Splitter, Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. J Immunol, 2002. 168(5): p. 2433-40.
65. Zhan, Y. and C. Cheers, Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. Infect Immun, 1993. 61(11): p. 4899-901.
66. Zhan, Y. and C. Cheers, Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. Infect Immun, 1995. 63(4): p. 1387-90.
67. Sathiyaseelan, J., *et al.*, Treatment of *Brucella*-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. Cell Immunol, 2006. 243(1): p. 1-9.
68. Svetic, A., *et al.*, *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN-gamma in CD4+ T cells. Int Immunol, 1993. 5(8): p. 877-83.
69. Fernandes, D.M. and C.L. Baldwin, *Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus*. Infect Immun, 1995. 63(3): p. 1130-3.
70. Rolan, H.G., *et al.*, Natural antibody contributes to host defense against an attenuated *Brucella abortus* virB mutant. Infect Immun, 2009. 77(7): p. 3004-13.
71. Goenka, R., *et al.*, B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus*. J Infect Dis, 2011. 203(8): p. 1136-46.

Tópicos selectos de biomedicina

72. Forestier, C., *et al.*, *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J Immunol*, 2000. 165(9): p. 5202-10.
73. Lapaque, N., *et al.*, Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. *Cell Microbiol*, 2006. 8(2): p. 197-206.
74. Barrionuevo, P., *et al.*, *Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect Immun*, 2008. 76(1): p. 250-62.
75. Durward, M., *et al.*, Active evasion of CTL mediated killing and low quality responding CD8+ T cells contribute to persistence of brucellosis. *PLoS One*, 2012. 7(4): p. e34925.
76. Barrionuevo, P., *et al.*, *Brucella abortus* induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8(+) T cell responses. *Cell Microbiol*, 2013. 15(4): p. 487-502.
77. Giambartolomei, G.H., *et al.*, Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J Immunol*, 2004. 173(7): p. 4635-42.

Trayectoria y alcances científicos en biomedicina molecular

GUZMÁN SÁNCHEZ SCHMITZ

Escuela de medicina de Harvard, Universidad de Harvard, División de Enfermedades Infecciosas del «Boston Children's Hospital». Boston, Massachusetts, Estados Unidos

Obtuve mi grado profesional por parte del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora en 1992, e ingrese a su planta laboral docente pocos años después.

El grado de Maestría en Ciencias lo obtuve por parte del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) en 1999. Mi proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de la Dra. Ester Orozco, líder mundial en la biología molecular de *Entamoeba histolytica*. Mi participación en este proyecto ayudó a la publicación del artículo científico titulado «*Cis-elements upregulate the activity of the Entamoeba histolytica EhPgp1 gene promoter* (PMID: 11070314)», donde se describe la región promotora mínima del gen *EhPgp1* que le confiere multi-resistencia a drogas a este protozoario. Aquí empleamos técnicas de Biología Molecular y Genética, tales como el diseño de plásmidos, secuenciación, síntesis de oligonucleótidos, transfección y ensayos de gen reportero Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT), entre otras (Figura 1).

En 1999, ingresé al programa de Doctorado en Ciencias del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, bajo la tutoría de la Doctora María Carmen Sánchez Torres. Es un honor haber sido uno de sus primeros estudiantes. Aquí comenzamos el estudio de una subpoblación minoritaria de monocitos circulantes humanos, caracterizados por expresar predominantemente el receptor Fc-gamma tipo III (CD16). Mi participación en este trabajo ayudó a la publicación del artículo científico titulado: *CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells* (PMID: 11717198). La importancia de este trabajo estriba en que los monocitos de sangre periférica son usados para terapia autóloga en pacientes con cáncer terminal y se sabe que ésta y otras enfermedades incrementan la presencia relativa de monocitos CD16+. En este trabajo empleamos técnicas de biología celular, como el aislamiento inmuno-magnético de monocitos humanos de sangre periférica, cultivos de diferenciación a células dendríticas (DCs) usando las citocinas GM-CSF y IL-4, microscopía e inmuno-fenotificación por citometría de flujo, entre otras. Los resultados demostraron que las DCs derivadas con ambos tipos de monocitos no eran equivalentes en cuanto a su capacidad para estimular respuestas inmunes de linfocitos T CD4+ (Figura 2).

Tendencias en investigación biomédica

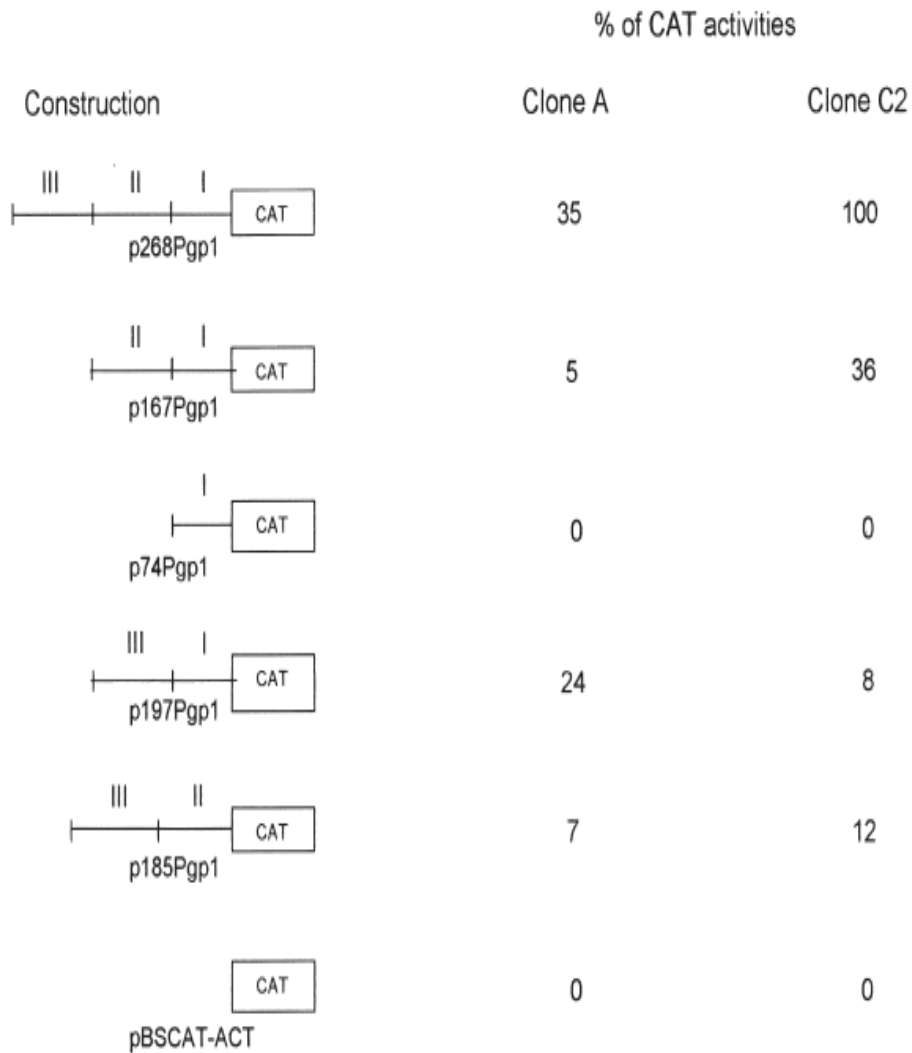


Figura 1. Functional activity of the minimal promoter of the *EhPgp1* gene. CAT activities were determined by comparison with the 100% activity obtained from the trophozoites of clone C2 transfected with the p268Pgp1 plasmid.

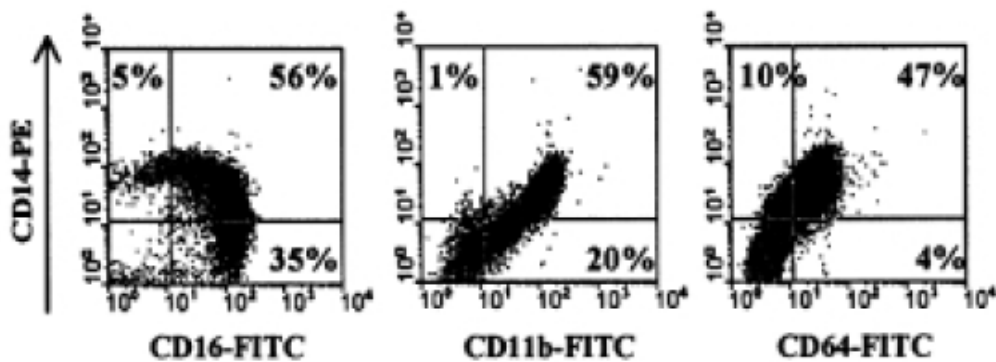


Figura 2. Two-color immunofluorescence analysis of CD16⁺ monocytes. Cells were labeled with FITC-conjugated anti-CD16, anti-CD11b or anti-CD64 mAb and PE-conjugated anti-CD14.

Tópicos selectos de biomedicina

En 1998, la Doctora Gwendalyn Jan Randolph, estudiante del padre de las Células Dendríticas, el Doctor y Premio Nobel Ralph M. Steinman (D.E.P.), publicó en la revista Science, un modelo tisular *in vitro* (*transendothelial trafficking*) que producía en forma autónoma células dendríticas, a partir de monocitos de sangre periférica. En términos celulares, este modelo reproduce a las vénulas poscapilares, carentes de las células accesorias que naturalmente estarían presentes en venas de mayor envergadura. A pesar de su sencillez, este modelo representa un gran porcentaje del sistema circulatorio humano, y es precisamente ahí donde la gran mayoría de los leucocitos circulantes ingresan al resto del cuerpo humano. Este modelo *in vitro*, se convirtió inmediatamente en la base de mi propuesta doctoral enfocada en comparar la diferenciación autónoma de monocitos CD16(-) and CD16(+) en DCs, evitando así el uso artificial de citoquinas. Este modelo tridimensional de ingeniería de tejidos requirió trabajar con cordones umbilicales de recién nacido para cosechar y cultivar células endoteliales humanas, así como extraer matriz extracelular de cartílago bovino o cola de rata y polimerizar la colágena sin desnaturalizarla. Debido a la calidad de este proyecto fue menester consultar detalles técnicos con la Dra. Randolph, quien amablemente decide invitarnos a visitar su laboratorio en el Departamento de Terapia Celular y Genética de la Escuela de Medicina Mount Sinai en la Ciudad de Nueva York, USA. Inicie trabajos experimentales en Enero del 2002 y mi trabajo me permitió participar en tres publicaciones científicas:

1). The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting (PMID: 12186843). En este trabajo encontramos que los monocitos CD16+ tenían preferencia en colonizar el modelo tisular y diferenciarse en DCs, y que la citocina TGF-β inducía rápidamente en los monocitos CD16- el fenotipo y capacidad preferencial migratoria de los monocitos CD16+ (Figura 3).

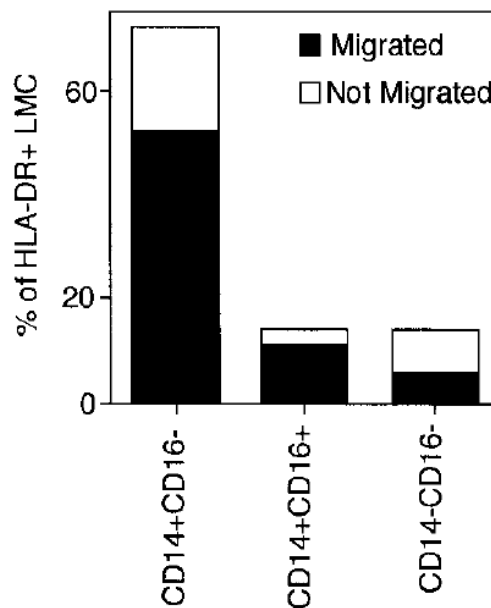


Figura 3. Transendothelial migration of blood DC precursors across unstimulated endothelium.

Tendencias en investigación biomédica

2). Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes (PMID: 15534368). En este trabajo analizamos el papel del receptor de quimocinas CCR8 en la migración de DCs hacia los ganglios linfáticos. Este trabajo involucró estudios simultáneos en ratón e *in vitro*, usando el modelo tisular humano (Figura 4).

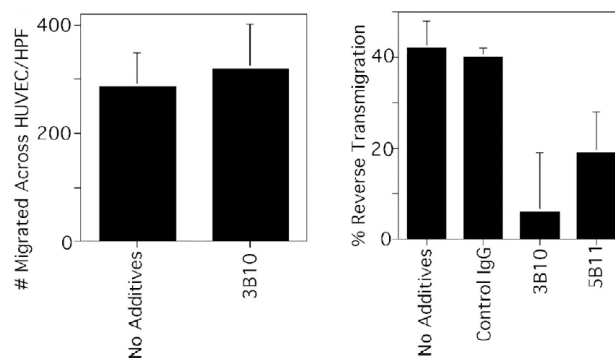


Figura 4. Inclusion of neutralizing anti-CCR8 mAb 3B10 during the assay when monocytes traverse endothelium in the apical-to-basal direction had no effect (left), but 3B10 anti-CCR8 mAb and anti-CCR8 mAb 5B11 significantly ($P < 0.005$) inhibited reverse transmigration.

3). Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances (PMID: 15338191). Esta es una revisión científica acerca de los factores entonces conocidos, gobernadores de la migración de DCs hacia los tejidos linfáticos.

Culminé mis estudios de doctorado en 2005 y fui contratado por una compañía biotecnológica de reciente creación, con sede en Florida, USA, enfocada en encontrar un modo de probar vacunas en forma rápida. Este proyecto, auspiciado por la Agencia de Proyectos de Investigación Avanzados de Defensa (por sus siglas en inglés: DARPA), me permitió incursionar en la microfisiología, buscando reproducir con mayor fidelidad, las respuestas observadas *in vivo* empleando ensayos *in vitro*, mediante el uso de condiciones de cultivo que mejor simulasen el microambiente natural para cada célula. Durante mi estancia en esta compañía registramos a nivel mundial más de 40 patentes («Sanchez-Schmitz Guzman»: <http://patentscope.wipo.int/search/en/result.jsf>) y participé en dos publicaciones científicas: 1). Assessing the immunopotency of Toll-like receptor agonists in an *in vitro* tissue-engineered immunological model (PMID: 20331478); 2). An immunologic model for rapid vaccine assessment - a clinical trial in a test tube (PMID: 19807200).

Por iniciativa de la Fundación *Bill y Melinda Gates* y del Dr. Ofer Levy, en 2010 ingresé a trabajar como científico de planta en la Escuela de Medicina de Harvard y el Hospital Infantil Boston (Boston Children's Hospital). Es aquí donde mi investigación se enfocó por primera vez en la creación de un modelo tisular que fuese 100 % humano, que sirviese para probar la eficacia de vacunas en recién nacidos, y que tuviese la capacidad para detectar respuestas inmunológicas específicas a partir de moléculas antigénicas únicas. ¿Por qué enfocarse a vacunas de recién nacido? Por el beneficio de salvar millones de infantes que mueren cada año debido a infecciones prevenibles mediante vacunación y al hecho particular de que los recién nacidos tienen un sistema inmunitario temporalmente distinto al de sujetos de mayor edad. Estos y otros

Tópicos selectos de biomedicina

tópicos fueron ampliamente discutidos en mi revisión científica publicada en Science Translational Medicine: Development of Neonatal and Infant Vaccines (PMID: 21734174) (Figura 5).

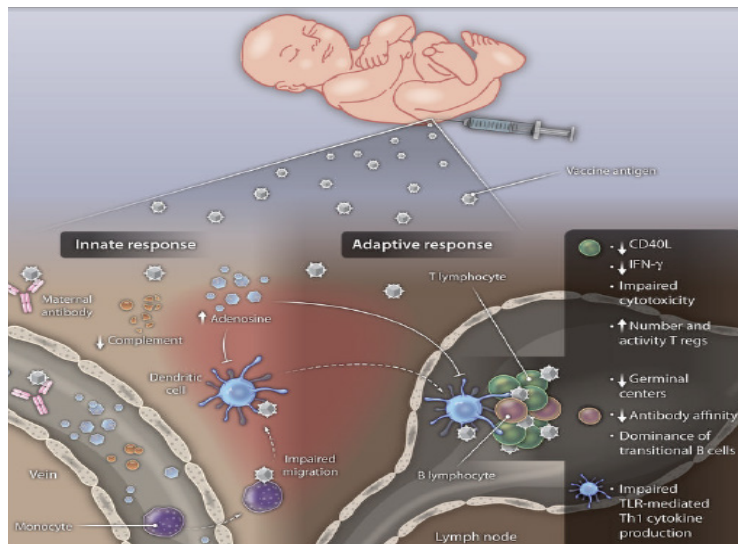


Figura 5. Distinct humoral and cellular components of the neonatal immune system. Neonatal blood plasma contains a different proportion of key immunomodulatory components than older individuals, including the presence of maternal antibodies, high concentrations of immunomodulatory adenosine, and reduced concentrations of complement, which are important to adaptive immune responses. Differences in neonatal leukocytes include impaired migration and reduced Th1-polarizing responses of neonatal APCs to most TLR agonists. T cell impairments include diminished CD40 ligand expression and reduced IFN-gamma production. Neonatal B cells are predominantly transitional and demonstrate impairments in antibody maturation and affinity.

El modelo tisular humano de recién nacido que hemos desarrollado ha sido exitosamente probado con vacunas comerciales dadas comúnmente a recién nacidos en todo el mundo, como *Bacille Calmette-Guérin* y *Hepatitis B*; así como la vacuna conjugada contra el neumococo (*Pneumococcal Conjugate Vaccine* o PCV). Estos resultados indican alentadoramente, que es posible reproducir *in vitro* las respuestas antígeno-específicas observadas *in vivo* en humanos recién nacidos. Un modelo neonatal humano como este, basado en células primarias autólogas cultivadas en microambientes fisiológicos, ayudará sin duda alguna a seleccionar vacunas, drogas y otros terapéuticos que sean efectivos y seguros a esta vulnerable edad. Esto es especialmente relevante en inmunología humana, donde los modelos animales sufren limitaciones significativas asociadas a su divergencia genética intrínseca. Nuestros planes futuros más próximos son la publicación de este trabajo y continuar su validación usando marcadores genéticos, así como incrementar su complejidad, adicionar respuestas de linfocitos B y establecer modelos inmuno-patológicos humanos.

Desde 2003, hemos establecido colaboraciones con los doctores Elsa Maribel Aguilar Medina, Alfredo Ayala Ham, Geovanni Romero Quintana y Rosalío Ramos Payán, de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, la cual ha resultado en la publicación de un artículo (PMID: 25506053) y la realización de proyectos relacionados con la caracterización inmunológica del Síndrome de Papillon-lefèvre, la caracterización de la microbiota y respuesta inmune en enfermedades pe-

Tendencias en investigación biomédica

riodontales y proyectos de ingeniería tisular para regeneración ósea. Recientemente también he establecido colaboración con el Dr. Klaus Schmitz-Abe para el estudio inmuno-genético de pacientes con autismo.

Finalmente, solo me resta agradecer al comité organizador del este evento por su amable invitación, que estoy seguro redundará en beneficio de la investigación científica nacional y abrirá camino a futuras colaboraciones.

Atentamente,

Guzman Sánchez-Schmitz, M.Sc., PhD.

The Division of Infectious Diseases, Boston Children's Hospital

Harvard Medical School, Harvard University

300 Longwood Avenue, Enders building, room 850.7

Boston, MA 02115

Cell phone: (508)-404-8618

E-mail: guzman.sanchez-schmitz@childrens.harvard.edu ; guzmanss@hotmail.com



Genética clínica y molecular

Tópicos selectos de biomedicina

Aplicaciones de los microarreglos en la genética clínica

CARLOS CÓRDOVA FLETES

Laboratorio de Citogenómica y Microarreglos, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, UANL.

INTRODUCCIÓN

La genética clínica es una especialidad médica que tiene como principales objetivos evaluar y diagnosticar condiciones clínicas que pueden tener una base genética, en aquellos sujetos o familias con o en riesgo (Clinical Genetics Society). El resultado es ofrecer consejo genético y eventualmente, el conocimiento y los elementos para mejorar el tratamiento de aquellos pacientes y formar una medicina preventiva/predictiva. Para ello, la genética clínica se apoya en múltiples herramientas diagnósticas clínicas y de laboratorio (e.g., Citogenética). El conocimiento genético generado a través del tiempo, tomando como punto de partida la genética mendeliana (herencia monogénica), ha proporcionado una serie de elementos para comprender, evaluar, diagnosticar y tratar múltiples condiciones genéticas dominantes o recesivas y no tradicionales. En ese sentido, eventos científicos específicos han facilitado la labor de la genética clínica actual; por ejemplo, el mapeo génico (Sturtevant, 1913), el establecimiento de técnicas para estudiar los cromosomas (Tjio & Levin, 1956), el desarrollo de los primeros métodos de secuenciación del ADN (Sanger y Maxam & Gilbert, 1977) y la invención de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Mullis, 1985). En conjunto con muchas otras herramientas moleculares, en 1990 se lanza el proyecto genoma humano para conocer a detalle su secuencia, finalizando en 2003. Esto ha permitido por un lado conocer la arquitectura genómica humana y por otro, identificar los mecanismos moleculares subyacentes a muchas patologías conocidas y a otras que no se comportan de «manera clásica», es decir, enfermedades con patrones de herencia «no tradicional» (e.g., patologías mitocondriales, por expansión de tripletes, por impronta genómica, por disomía uniparental, etc.). Paralelamente, se han desarrollado nuevas herramientas de análisis genómico y de diagnóstico de aquellas enfermedades así como diversas bases de datos que albergan información genómica y clínica (e.g., DGV, DECIPHER, ISCA, etc.).

VARIABILIDAD GENÓMICA, FENOTIPO Y ENFERMEDAD

La base para la variabilidad genómica humana incluye múltiples cambios en el ADN, los cuales por lo general, se distinguen unos de otros por su tamaño, origen y región dentro del genoma. Por ejemplo, uno de los cambios más frecuentes en el genoma humano son las variantes o polimorfismos de un solo nucleótido (SNV o SNP). La gran mayoría de ellos se localizan en regiones no codificantes. Actualmente

Genética clínica y molecular

se han descrito alrededor de 15 millones de SNP en el genoma humano gracias al proyecto del HapMap (Vucic *et al.*, 2010).

Otras variantes en el genoma humano incluyen duplicaciones de segmentos (regiones que presentan una versión dentro del genoma con más del 90 % de homología), secuencias repetidas en tandem, inserciones, inversiones y elementos repetidos intercalados. Asimismo, las variantes en el número de copias (CNV) —producto de algunas de las variantes arriba mencionadas— representadas por regiones perdidas o duplicadas de alrededor de 1 kb a 1 Mb o más, y cuyo número de copias varía con respecto a un genoma de referencia, son una importante fuente de variabilidad genómica humana. Se ha observado que las diferencias en CNV entre individuos explica parcialmente la individualidad humana, en tanto que la similitud en CNV puede indicar una relación sub-poblacional. Al igual que los SNP, cuando CNV ocurren en más del 1 % de la población se denominan polimorfismos del número de copias (CNP). Se cree que aproximadamente el 12 % del genoma humano tiene CNV, con el 10-60 % de ellas abarcando genes. De ésta manera, CNV particulares pueden influenciar la expresión génica (incluso de aquellos genes contiguos a la CNV) y por tanto la variación fenotípica debido a la interrupción de genes o a la descompensación de dosis génica, incrementando la susceptibilidad a desarrollar enfermedades (Vucic *et al.*, 2010).

Notablemente, los genes encontrados en regiones ricas en CNV se han implicado en la percepción sensorial, metabolismo, adhesión celular, procesos neurofisiológicos y, claro, en distintas enfermedades. De ésta manera, las CNV se han clasificado en benignas, patogénicas o de significancia clínica incierta (SCI o VOUS). Las CNV benignas a menudo no se relacionan con efectos fenotípicos observables ya que generalmente se asocian a regiones no funcionales del genoma, son heredadas y se presentan en individuos sanos. Sin embargo, se ha demostrado que tales CNV modifican los procesos inflamatorios, la respuesta inmune, la respuesta a drogas y la señalización celular. Por otra parte, CNV que afectan ADN funcional pueden ser patogénicas. Se cree que la mayoría de las CNV patogénicas son *de novo* (de línea germinal, no heredadas pero si «heredables») aunque algunas son heredadas (Vucic *et al.*, 2010). Las de SCI, presentan características de las primeras dos, pero su relación con el fenotipo clínico no es claro. Viéndolo desde otro enfoque, las CNV también pueden identificar vías haplosuficientes, es decir, identificar aquellos genes que con una dosis génica menor pueden participar de manera correcta en sus vías, o dicho de otra manera, representar genes recesivos (Cody *et al.*, 2009).

Las CNV se han relacionado como factores patogénicos importantes en cáncer y diversos desordenes genéticos (e.g., autismo, discapacidad intelectual, etc.). Algunas CNV se asocian a genes supresores de tumor y/o a oncogenes, suponiendo un papel potencial de tales CNV en la susceptibilidad al cáncer y a su vez en un blanco potencial de terapia (eg., Vucic *et al.*, 2010; Girirajan *et al.*, 2010).

HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN CLÍNICA

Tradicionalmente, los reacomodos genómicos/cromosómicos han sido analizados mediante cariotipo e hibridación in situ fluorescente (FISH); sin embargo, los límites de resolución de estas metodologías no permiten definir en forma fina los cambios que están ocurriendo en el genoma, es decir, reacomodos submicroscópicos no serán identificados. En cambio, ~10-20 % de los reacomodos submicroscópicos pueden ser detectados mediante microarreglos basados en hibridación genómica comparativa (aCGH).

Tópicos selectos de biomedicina

En términos generales, los microarreglos son micromatrices que contienen genomas de referencia para ser comparados con un genoma blanco o problema y otro(s) de referencia (dependiendo de la plataforma); los microarreglos varían principalmente en cuanto a contenido de sondas y a resolución. En los últimos 7-8 años, las plataformas de microarreglos han sido y son una de las metodologías de estudio genómico humano más importantes en el mundo, no solo para investigación sino también para diagnóstico de muchas enfermedades congénitas y cáncer (esporádico o familiar). De hecho, en muchos países, la tecnología de alta resolución de microarreglos ha permitido incorporar el análisis genómico fino como una prueba genética-clínica frecuente o de «primera línea» para pacientes con enfermedades congénitas. Por otra parte, los microarreglos de alta resolución, también han permitido estudiar otras enfermedades de índole infecciosa desde diferentes enfoques como por ejemplo, las CNV del gen *CCL3L1* que inducen susceptibilidad a infección por VIH (Liu *et al.*, 2010, Vucic *et al.*, 2010). Además, la versatilidad que ofrecen los microarreglos genómicos puede incluir el análisis de ARNm, microARN y metilación de promotores génicos en el estudio de enfermedades; siendo así los microarreglos una herramienta de base y complementaria en casi cualquier investigación biomédica actual. La alta resolución de los microarreglos permite establecer asociaciones genotipo-fenotipo más precisas, ya que permiten delinear genéticamente diferentes CNV y/o reacomodos genómicos.

Hoy en día, la gran mayoría de las plataformas de microarreglos de alta resolución incluyen sondas para polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Esto ha permitido identificar mecanismos patogénicos (no asociados a cambios de número de copias) como disomía uniparental (UPD) o pérdida de heterocigosidad de copia neutral (CN-LOH) en desordenes bien conocidos o no caracterizados. El potencial clínico de este tipo de abordajes genómicos es patente en el desenmascaramiento de alelos recesivos mutantes o fenotipos asociados a impronta genómica alterada (Kearney *et al.*, 2011). Las CN-LOH se han relacionado o estudiado principalmente en cáncer (Lapunzina and Monk, 2011), aunque se está incrementando la descripción de pacientes con retraso del desarrollo y/o discapacidad intelectual (DI) y CN-LOH largas constitutivas (Bruno *et al.*, 2009; Alkuraya, 2010; Papenhausen *et al.*, 2011; Howell *et al.*, 2013; Zilina *et al.*, 2014, Cordova-Fletes *et al.*, datos por publicar). Cuando segmentos largos de marcadores de SNP homocigotos ocurren en una secuencia ininterrumpida (generalmente >1Mb), se denominan segmentos o tramos largos de homocigosidad (LCSH) o corridas/regiones de homocigosidad (ROH). Muchos factores tales como la tasa de mutación, ancestría, estructura poblacional, UPD, selección natural, recombinación y desequilibrio de ligamiento, pueden influenciar la longitud, abundancia y localización de las ROH (Gibson *et al.*, 2006). Posiblemente, una explicación común para los LCSH es un evento de autocigosidad (Gibson *et al.*, 2006; Alkuraya, 2010). Ello ocurre cuando ambos alelos en el bloque de homocigosidad son «idénticos por descendencia», tienen pocos eventos de recombinación (en el tiempo para «interrumpir el segmento») y se presentan en poblaciones estrechas con una alta tasa de endogamia (Gibson *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Hampshire *et al.*, 2006). Si o no un LCSH es patogénico, probablemente dependerá de la localización/contenido génico/tamaño, epigenética y los rasgos relacionados con recesividad (Gibson *et al.*, 2006; Papenhausen *et al.*, 2011, Lapunzina and Monk, 2011, Córdoba-Fletes *et al.*, datos por publicar).

Tomando conjuntamente los antecedentes arriba mencionados, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio genómico —por microarreglos (comerciales o personalizados)— de diversas enfermedades congénitas, conocidas y no conocidas, asociadas o no con cambios en el número de copias, con la intención de precisar la asociación genotipo-fenotipo y ofrecer un diagnóstico molecular preciso

con su respectivo asesoramiento genético. Producto de ello, se han delineado genéticamente deleciones, duplicaciones (en tándem o a partir de marcadores supernumerarios cromosómicos), reacomodos cromosómicos complejos y translocaciones cromosómicas citogenéticamente equilibradas (Córdova-Fletes *et al.*, 2010; Neira *et al.*, 2012; Córdova-Fletes *et al.*, 2012; Neira *et al.*, 2013; Martínez-Jacobo *et al.*, 2013; Córdova-Fletes *et al.*, 2014; Córdova-Fletes *et al.*, 2015; Vásquez-Velásquez *et al.*, 2015; Lara-Navarro *et al.*, 2015; *datos por publicar*). Adicionalmente, como resultado inherente al estudio de aquellos pacientes y sus padres, hemos iniciado una base de datos interna/local de CNV potencialmente «benignos» o de SCI, lo cual podrá ayudar en el futuro cercano a encontrar nuevas asociaciones en diferentes enfermedades hereditarias (e.g., autismo). En línea, recientemente, se han identificado CNV de riesgo para fenotipos neuropsiquiátricos que muestran expresividad variable dependiendo de la presencia (o ausencia) de CNV concomitantes, apoyando un «modelo de doble golpe» (Girirajan *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

Los microarreglos de CGH y/o SNP, son una herramienta esencial para estudiar la arquitectura genómica subyacente a la variabilidad fenotípica y enfermedad humana. Por lo tanto su inclusión como una prueba genética-clínica de «primera línea» permitirá proporcionar un diagnóstico molecular preciso y, eventualmente, esto conducirá a crear nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la calidad de vida de aquellos pacientes así como incrementar nuestro conocimiento del genoma y sus implicaciones en la enfermedad humana.

REFERENCIAS

- Alkuraya F.S., 2010. Autozygome decoded. *Genet Med.* 12:765–71.
- Bruno D.L., *et al.*, 2009. Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *J. Med. Genet.* 46:123–131.
- Clinical Genetics Society, 2015. <http://www.clingensoc.org/what-is-clinical-genetics/>
- Cody J., *et al.*, 2009. Narrowing critical regions and determining penetrance for selected 18q- phenotypes. *Am J Med Genet A.* 149A(7):1421-30.
- Córdova-Fletes C., *et al.*, 2010. CDKL5 truncation due to a t(X;2)(p22.1;p25.3) in a girl with x-linked infantile spasm syndrome. *Clin Genet.* 77: 92–96.
- Córdova-Fletes C., *et al.*, 2012. A de novo sSMC(22) characterized by high-resolution arrays in a girl with cat-eye syndrome without coloboma. *Mol. Syndromol.* 3:131–135.
- Córdova-Fletes C., *et al.*, 2014. De novo dir dup/del of 18q characterized by snp arrays and fish in a girl with mixed phenotypes, *J. Genet.* 93:869–873.
- Córdova-Fletes C., *et al.*, 2015. A de novo t(10;19)(q22.3;q13.33) leads to *ZMIZ1/PRR12* reciprocal fusion transcripts in a girl with intellectual disability and neuropsychiatric alterations. *Neurogenetics.* 16:287–298.

Tópicos selectos de biomedicina

- Gibson J., *et al.*, 2006. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum. Mol. Genet.* 5:789–795.
- Girirajan S., 2010. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet.* 42(3):203-9.
- Hampshire D.J., *et al.*, 2006. MORM syndrome (mental retardation, truncal obesity, retinal dystrophy and micropenis), a new autosomal recessive disorder, links to 9q34. *Eur. J. Hum. Genet.* 14:543–548.
- Howell K.B., *et al.*, 2013. High resolution chromosomal of postnatal constitutional copy number variants. *Genet. Med.* 13:680–685.
- Kearney H.M., *et al.*, 2011. Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting deleterious variation. *Am. J. Hum. Genet.* 93:90–102.
- Lara-Navarro I., *et al.*, 2015. A further inv dup/del 9p de novo rearrangement. Reappraisal of 25 instances. *Gene Reports.* Vol. 0:0–0.
- Lapunzina P., Monk D., 2011. The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer. *Biol. Cell.* 103:303–317.
- Li L.H., *et al.*, 2006. Long contiguous stretches of homozygosity in the human genome. *Hum. Mutat.* 27:1115–1121.
- Liu S., *et al.*, 2010. CCL3L1 copy number variation and susceptibility to HIV-1 infection: a meta-analysis. *PLoS One.* 5(12):e15778.
- Martínez-Jacobo L.A., 2013. Delineation of a de novo 7q21.3-q31.1 deletion by CGH-SNP arrays in a girl with multiple congenital anomalies including severe glaucoma. *Mol. Syndromol.* 4:285–291.
- Neira V.A., *et al.* 2013. De novo *MECP2* disomy in a Mexican male carrying a supernumerary marker chromosome and no typical Lubs syndrome features. *GENE*, Vol.524, 381–385.
- Neira V.A., *et al.*, 2012. Complex 9p rearrangement in an XY patient with ambiguous genitalia and features of both 9p duplication and deletion. *Am. J. Med. Genet.* 158A:1498–1502,
- Papenhausen P., *et al.*, 2011. UPD detection using homozygosity profiling with a SNP genotyping microarray. *Am. J. Med. Genet. A* 155A:757–768.
- Vásquez-Velásquez A.I., *et al.*, 2015. Two girls with a de novo Xq rearrangement of paternal origin: t(X;9)(q24;q12) or rea(X)dup q. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology.* Vol. 0:0–0.
- Vucic E.A., *et al.*, *Genetic Variation: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 628. Michael R. Barnes and Gerome Breen (eds.).
- Zilina O., *et al.*, 2014. Chromosomal microarray analysis as a first-tier clinical diagnostic test: Estonian experience. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2:166–175.

Tópicos selectos de biomedicina

Alcances y perspectivas de la genética forense

DR. EN C. HÉCTOR RANGEL VILLALOBOS¹

INTRODUCCIÓN

En 1985 Alec Jeffreys implementó el uso del material genético (ADN) para identificación humana, obteniendo un patrón de bandas parecido a un código de barras al que denominó huella digital del ADN (DNA fingerprinting). Actualmente a esta prueba se le conoce como perfil de ADN, huella genética, o simplemente prueba de ADN. Este perfil de ADN se ha demostrado que es prácticamente único e irreplicable, a excepción de los gemelos monocigotos,² lo que permite diferenciar a cualquier persona de otra y establecer sus relaciones biológicas de parentesco. Las aplicaciones de la prueba de ADN son diversas, pero destacan dos, las pruebas de paternidad y los análisis forenses; este último en casos criminales para establecer la relación de un sospechoso con la evidencia dejada en la escena de un crimen (p. ejem. mancha de sangre o semen), para incriminarlo o, en su caso, exonerarlo. Otras aplicaciones menos comunes son para establecer relaciones familiares de restos cadavéricos en casos de desastres masivos o personas desaparecidas, en investigaciones históricas (p. ejem. restos de la familia Romanov, origen de Cristóbal Colón, etc.), o en antropología al analizar poblaciones humanas para estudiar su origen y evolución.

¹ El Dr. Héctor Rangel Villalobos es Biólogo, Maestro y Doctor en Genética Humana egresado de la Universidad de Guadalajara (UdeG); además de ser responsable científico del laboratorio de pruebas de paternidad DNA Profile SC (www.perfiladn.com.mx). Es profesor-investigador titular del CUCienega-UdeG, donde dirige el Instituto de Investigación en Genética Molecular en Ocotlán, Jalisco. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI nivel II), del Grupo Español-Portugués de la International Society of Forensic Genetics (GEP-ISFG), así como de la Sociedad Latinoamericana de Genética Forense (SLAGF), y de las Asociaciones Mexicanas de Genética Humana (AMGH) y Antropología Biológica (AMAB). Ha recibido financiamiento para sus investigaciones de CONACyT Ciencia Básica (2000, 2005, y 2009), del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYT-JAL-2008), de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID-2009) y de las empresas QIAGEN México (2014) y Distribuidora Comercial Zogbi SA de CV (2015). Es autor de alrededor de 100 publicaciones, incluyendo capítulos en libros, artículos científicos en revistas indexadas y de divulgación científica relacionados con la prueba de ADN, estudios en población mexicana con enfoque forense, antropológico y biomédico. Ha dirigido y/o asesorado varias tesis de licenciatura, maestría y doctorado en el área de Ciencias de la Salud, y ha participado como ponente o conferencista en docenas de eventos científicos relacionados con la genética desde 1997. Ha recibido varias distinciones, entre las que destacan: mención honorífica en tesis de maestría (1998), preselección al mérito académico en el área de Ciencia e Investigación por el STAUdeG (2002), cinco veces ganador del premio «HECTOR MARQUEZ MONTER» al mejor trabajo de investigación por la Asociación Mexicana de Genética Humana (1999, 2004, 2008, 2010 y 2014) más una mención honorífica (2012), nombrado «Biólogo Destacado» por los Biólogos Colegiados de Jalisco (2005). Fue asesor del trabajo que obtuvo el «Premio Chihuahua 2006» en Ciencias Biológicas, y ganador de dos Premios Nacionales del INAH (2007 y 2009).

² Gemelos monocigotos: Aquellos hermanos que provienen del mismo cigoto.

Genética clínica y molecular

GENOMA HUMANO Y MARCADORES MOLECULARES

A la dotación completa de material genético que recibimos de nuestros padres se le denomina genoma,³ y se localiza en el núcleo de prácticamente todas nuestras células, por lo que teóricamente es posible realizar la prueba de ADN a partir de una sola célula de casi cualquier tejido. Los humanos recibimos una dotación genética doble, vía paterna y materna, que constituye nuestro genoma, de la cual solo una pequeña porción sirve o se «expresa» para formar proteínas (menos del 5 %); a los fragmentos del genoma con una secuencia de nucleótidos que sirve para formar una proteína se les denomina genes.⁴ Considerando la gran cantidad de información que contiene el genoma, podemos visualizar su potencial para identificación humana.

La prueba de ADN se realiza analizando secuencias variables en el genoma, es decir, que entre los individuos de una población puede tener diferentes formas alternas denominadas alelos.⁵ Estas secuencias conocidas como marcadores genéticos o marcadores moleculares⁶ permiten, por un lado, diferenciar a un individuo de otro, y por otro establecer relaciones biológicas de parentesco, ya que se heredan de padres a hijos. Cabe señalar que para cada marcador una persona tendrá dos alelos, uno materno y otro paterno, y a dicha combinación de alelos que recibimos de nuestros padres se le denomina genotipo.⁷ Específicamente las secuencias o marcadores empleados para realizar una prueba de ADN se caracterizan por tener repeticiones cortas en tándem,⁸ y son ampliamente conocidos por sus siglas en inglés como STRs (short tandem repeats) o microsatélites. A lo largo del genoma se encuentran miles de STRs que pueden ser usados como marcadores moleculares. Como su nombre lo dice, los STRs se componen de secuencias cortas repetidas, por ejemplo GATA, formando diversos alelos que se nombran por el número de veces que se encuentre la secuencia repetida; por ejemplo, el alelo 4 presentará cuatro veces la secuencia (p. ejem. GATA, GATA, GATA, GATA), y en una población podrían existir los alelos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, etc. El par de alelos o genotipo de una persona para cada marcador STR (p. ejem. 6/9), permite diferenciarlo o relacionarlo con otras personas (Figura 1).

³ Genoma: Dotación genética completa que caracteriza a un individuo o una especie

⁴ Gen: Fragmento de ADN con información para codificar una proteína.

⁵ Alelo: Forma alterna de una secuencia o fragmento de ADN

⁶ Marcador genético-molecular: Secuencia de ADN variable que presenta más de un alelo en la población, y que permite diferenciar el genoma materno del paterno en un individuo, como diferenciar individuos entre sí

⁷ Genotipo: Combinación de alelos de un individuo para un gen o secuencia de ADN específica

⁸ Marcador STR: Del inglés, short tandem repeats, cuya variabilidad se basa en el número de veces que se repite una secuencia corta (p. ejem. GATA); los alelos suelen definirse por el número de repeticiones

Tópicos selectos de biomedicina

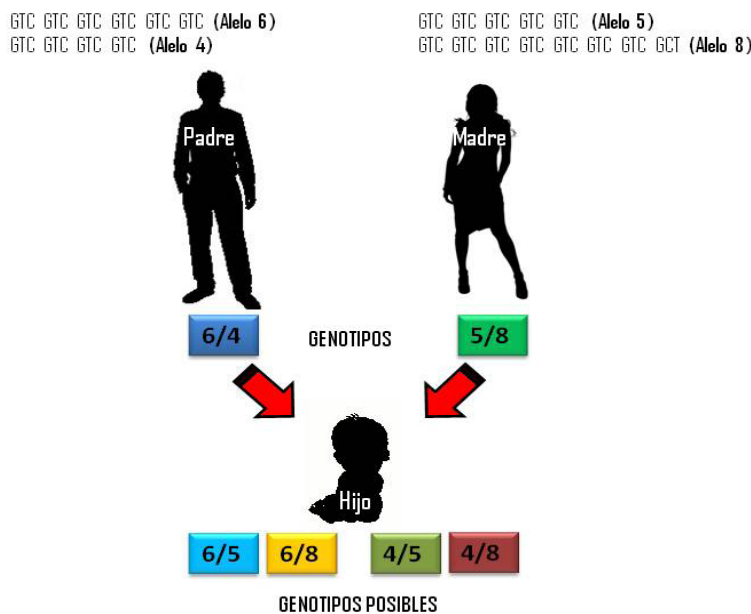


Figura 1. Uso de los marcadores STRs para identificación humana. Los genotipos permiten establecer las relaciones de parentesco y diferenciar a un individuo de otro. De una pareja de heterocigotos se generan hasta cuatro genotipos diferentes en sus hijos.

TÉCNICA PARA OBTENER EL PERFIL DE ADN

Cuando la persona presenta dos alelos diferentes (uno materno y otro paterno), se dice que su genotipo es heterocigoto;⁹ mientras cuando tiene un solo alelo se asume que recibió el mismo alelo de ambos padres, y se dice que su genotipo es homocigoto¹⁰ para el STR en cuestión. En una pareja de heterocigotos para alelos diferentes se pueden generar hasta cuatro genotipos distintos en sus hijos, lo que permite diferenciar individuos estrechamente relacionados como los hermanos (Figura 1). El primer paso para obtener un perfil genético consiste en extraer y cuantificar el ADN, lo cual se hace a partir de casi cualquier muestra biológica. El segundo paso se basa en generar millones de copias (amplificar) de varios marcadores STRs mediante la técnica de PCR¹¹ (polymerase chain reaction) multiplex, lo cual se hace con kits que se mencionaran posteriormente. Cabe mencionar que durante este proceso se usan primers marcados con diferentes fluorocromos,¹² lo cual es esencial para diferenciar STRs del mismo tamaño (pero diferente

⁹ heterocigoto: Individuo que presenta un genotipo con un par de alelos diferentes para cierta secuencia de ADN (gen o marcador genético)

¹⁰ homocigoto: Individuo que presenta un solo alelo en cierta secuencia de ADN (gen o marcador genético). Presumiblemente ambos padres le heredaron el mismo alelo

¹¹ PCR: siglas en inglés de “Reacción en cadena de la polimerasa”, técnica para replicar in vitro alguna secuencia de interés en el ADN, que genera millones de copias (amplifica) de ésta

¹² Fluorocromo: Molécula capaz de emitir fluorescencia después de un período de excitación

Genética clínica y molecular

color) durante la detección. El tercer paso es la electroforesis capilar (EC)¹³, en la que se separan los productos de PCR (amplificados) aprovechando que la longitud de los alelos STRs va a ser diferente de un alelo de otro, por lo que los más pequeños corren más rápido mientras los más grandes se van retrasando (Figura 2). Durante la EC también se corren fragmentos de tamaño conocido (size standard), así como una mezcla de los principales alelos STRs que se están analizando, lo que se conoce como escalera alélica¹⁴ o ladder. Estas referencias hacen relativamente sencillo definir los alelos, genotipos y posteriormente el perfil genético de una persona. En el cuarto paso, dentro de la EC, se detecta la fluorescencia en los STRs amplificados, size standard y ladder. La detección se lleva a cabo cuando los STRs llegan a una ventana donde pasa un rayo laser que excita a los fluorocromos, que a su vez emiten fluorescencia detectada en una cámara CCD, la cual separa por color esa energía luminosa (deconvulsión) y la convierte en impulsos electrónicos, que finalmente son presentados gráficamente en un electroferograma¹⁵ (Figura 3).

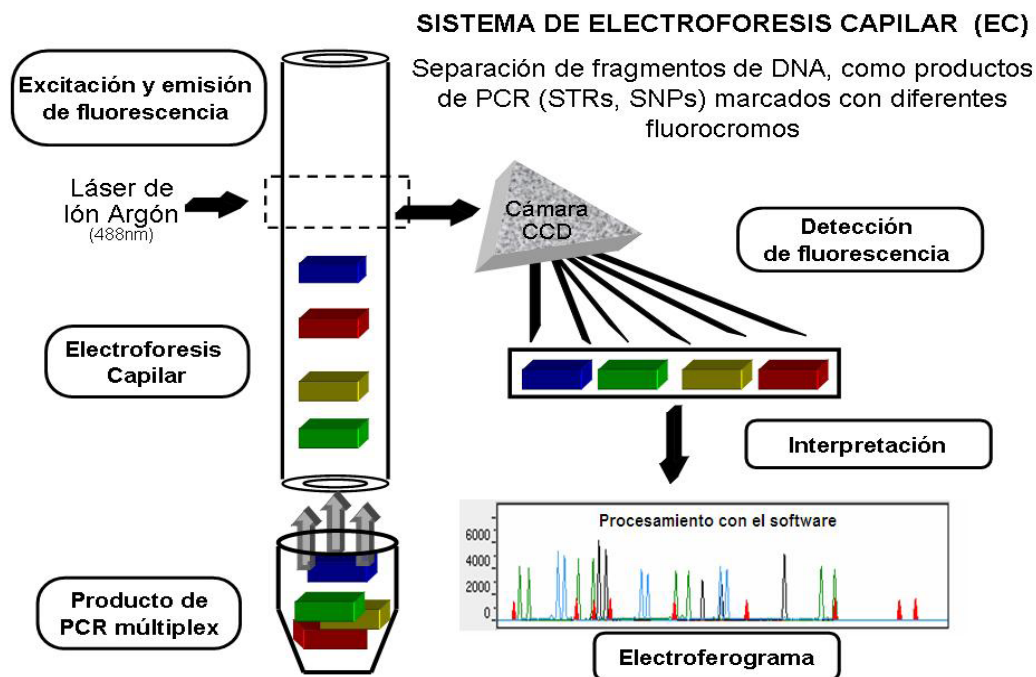


Figura 2. Representación de los pasos que involucra el análisis de fragmentos de ADN por electroforesis capilar (EC).

En el cuarto paso, dentro de la EC, se detecta la fluorescencia en los STRs amplificados, size standard y ladder. La detección se lleva a cabo cuando los STRs llegan a una ventana donde pasa un rayo laser que

¹³ Electroforesis capilar: Separación de una molécula en un medio de soporte (capilar relleno de polímero) por acción de un campo eléctrico, en base a su carga, peso molecular y forma.

¹⁴ Escalera alélica (ladder): Fragmentos de ADN que contienen todos o la mayoría de alelos de uno o varios STRs de un sistema genético, los cuales sirven de referencia para definir por comparación el alelo del individuo.

¹⁵ Electroferograma: Gráfica cuyos picos que representan fragmentos de ADN amplificados (STRs) marcados con fluorocromos y como fueron migrando a través del capilar, determinando así su tamaño (pb) y la fluorescencia que emiten (color).

Tópicos selectos de biomedicina

excita a los fluorocromos, que a su vez emiten fluorescencia detectada en una cámara CCD, la cual separa por color esa energía luminosa (deconvulsión) y la convierte en impulsos electrónicos, que finalmente son presentados gráficamente en un electroferograma¹⁶ (Figura 3).

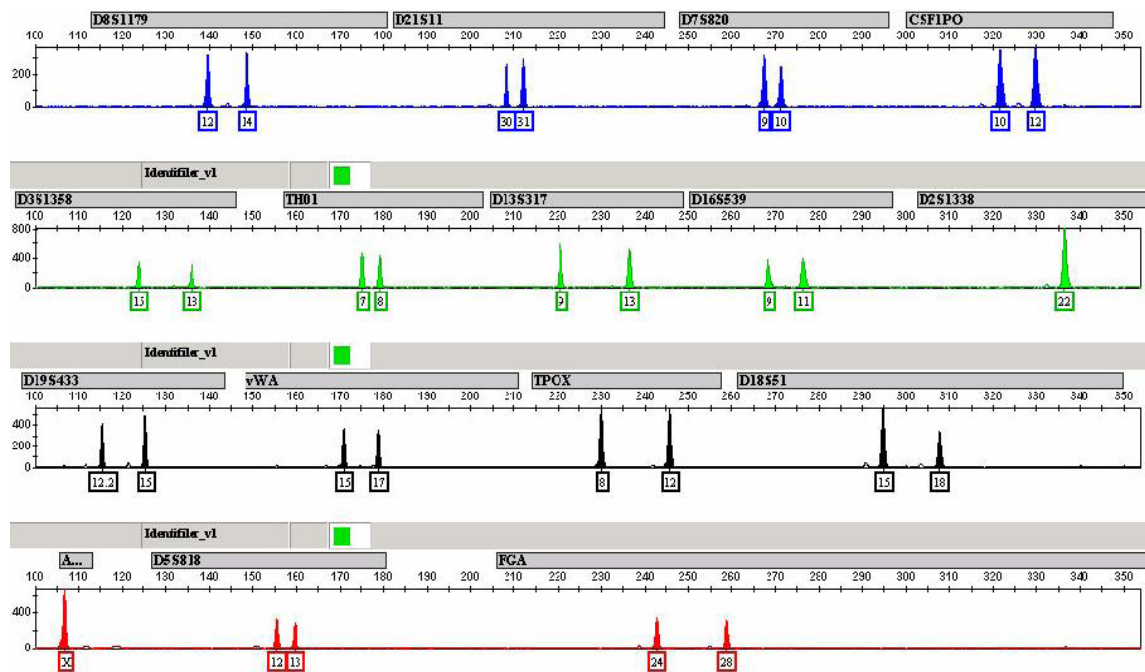


Figura 3. Electroferograma del perfil genético de un individuo. El tamaño en nucleótidos (pb) y nombre del STR se muestra en la parte superior de cada carril. Debajo de cada pico se indican los alelos del individuo. Para amelogenina se observa solo un pico y una X (mujer, XX).

Para obtener perfiles genéticos, existen diferentes kits o sistemas genéticos¹⁷ que hasta hace poco amplificaban 16 marcadores, 15 STRs y un marcador sexual llamado amelogenina¹⁸ que define el sexo de la muestra. Desde hace unos cuantos de años se han mejorado tales kits, que ahora incluyen hasta 22 STRs, un STR del cromosoma sexual Y (Y-STR), y amelogenina.

¹⁶ Electroferograma: Gráfica cuyos picos que representan fragmentos de ADN amplificados (STRs) marcados con fluorocromos y como fueron migrando a través del capilar, determinando así su tamaño (pb) y la fluorescencia que emiten (color).

¹⁷ Kit o sistema genético: Conjunto de marcadores genéticos (STRs) que pueden ser analizados simultáneamente, por ejemplo por PCR multiplex y electroforesis capilar

¹⁸ Amelogenina: Marcador que define en el perfil genético si el individuo es hombre (XY) o mujer (XX)

Genética clínica y molecular

INTERPRETACIÓN

En casos criminales se compara la evidencia biológica (sangre, cabello, semen, etc.) encontrada en la escena de un crimen con un sospechoso, donde la concordancia o diferencia en perfiles puede inculparlo o exonerarlo, respectivamente, ante un juez que evalúa toda la evidencia del caso. Sin embargo, mientras la no-concordancia suele ser incuestionable, cuando concuerdan los perfiles de la evidencia y el sospechoso se debe hacer una valoración bioestadística obteniendo una razón de verosimilitud, conocida por sus siglas en inglés como LR (likelihood ratio). El LR indica cuantas veces es más probable la hipótesis del fiscal (H_f), que el sospechoso es fuente de la evidencia biológica, respecto a la hipótesis de la defensa (H_d), es decir, que la fuente es algún otro individuo de la población. Para estimar H_d se usan las frecuencias alélicas de los STRs en la población, dato que normalmente se encuentra en publicaciones científicas. Similarmente, en paternidad se espera que entre el perfil de ADN de un supuesto padre (SP) e hijo (H) exista al menos una concordancia para todos los marcadores STRs empleados en la prueba. Cuando para más de un marcador no hay concordancia entre SP y H, se establece una exclusión y el resultado suele ser incuestionable, exceptuando casos de mutación¹⁹ o alelos null.²⁰ Sin embargo, cuando concuerdan el SP y H se estima un índice de paternidad (IP) que indica cuantas veces es más probable haber encontrado la concordancia (match) considerando que el SP sí está implicado, respecto a que no lo este, es decir, que otro individuo de la población sea el padre de H.

STRs DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES (Y-STRs Y X-STRs)

Los STRs de los cromosomas sexuales (X-Y), han surgido como herramientas complementarias para resolver casos complejos en situaciones donde se cuenta con pocos o ningún familiar para la prueba. Los STRs del cromosoma Y (Y-STRs), al heredarse casi totalmente en bloque de padre a hijos varones, permite establecer la paternidad sin que participe el supuesto padre, sólo comparando con un varón emparentado vía paterna (abuelo, tío, hermano, etc.). Además de la gran capacidad de exclusión, los Y-STRs se han convertido en herramientas de rutina en laboratorios forenses, ya que permiten obtener exclusivamente el perfil del perpetrador en mezclas de ADN masculino:femenino, lo cual es común en violaciones, evitando la extracción diferencial. Por su parte, los STRs del cromosoma X (X-STRs) fueron desarrollados más recientemente y han demostrado su principal potencial para resolver casos complejos de paternidad, como cuando se quiere establecer una hermandad o media hermandad y no hay familiares disponibles. Esto es fácil de entender analizando su herencia, ya que los varones sólo tienen un cromosoma X, por lo que lo heredarán sin excepción a todas sus hijas (no hijos, a quienes hereda el cromosoma Y). También los X-STRs han demostrado su utilidad para resolver casos de incesto o donde están implicados varones emparentados, donde han podido descartar el caso de incesto o encontrar al verdadero padre, respectiva-

¹⁹ Mutación. Cambio en el material genético. En el contexto del manuscrito se refiere a aquellas entre padre e hijo que generan una falsa exclusión. Suelen identificarse por ser de un paso (e.g. alelo 14→15).

²⁰ Alelo null. Alelo no detectable por problemas técnicos como mutaciones en el sitio donde anilla el primer durante la PCR, que suele causar falsas exclusiones (2do orden) donde padre e hijo se presentarían como homocigotos para diferentes alelos.

Tópicos selectos de biomedicina

mente, mientras los STRs autosómicos ofrecían valores de LR que podrían haber incriminado falsamente al implicado. A la fecha están disponibles para identificación humana un kit comercial (ArgusX-12 de Qiagen) y uno no-comercial reportado en la literatura científica, lo cuales permiten el análisis relativamente sencillo de 12 y 10 X-STRs, respectivamente.

OTROS SISTEMAS GENÉTICOS

Además de los STRs, el análisis de la secuencia de nucleótidos de la region hipervariable (HRV-I, II y III) del ADN mitocondrial (ADNmt) es una de las regiones usualmente analizadas por los genetistas forenses, principalmente para analizar muestras biológicas bastante degradadas como restos cadavéricos antiguos. Esto se debe a que varias copias del ADNmt se encuentran en una sola célula y relativamente en protegidas dentro de las estructuras celulares llamadas mitocondrias. Entre sus desventajas, además de la relativa mayor complejidad de la técnica de secuenciación, su aplicación en paternidad es nulo por su herencia es materna, por lo que permite establecer sólo la maternidad.

En los últimos años también se han desarrollado diferentes sistemas genéticos para identificación humana usando las plataformas disponibles en los laboratorios de genética forense, particularmente los analizadores genéticos o secuenciadores. Entre ellos, los SNPs²¹ (single nucleotide polymorphisms) que aunque se requieren de 30 a 50 para obtener la misma informatividad que los STRs autosómicos, parecían promisorios por su baja tasa de mutación (importante para evitar falsas exclusiones de paternidad) y la ventaja de ser amplificados en múltiples fragmentos cortos, lo que aumenta la posibilidad de obtener un perfil genético a partir de ADN viejo o degradado. Sin embargo, su implementación no ha prosperado por la relativa complejidad de la técnica de análisis (SNaPshot)²² que implicar varios pasos adicionales a la EC, que aumentaría la ya pesada carga de trabajo de los genetistas forenses. Por el contrario, las inserciones-delecciones (indels)²³ sólo requieren la EC después de la PCR multiplex (igual que los kits STRs tradicionales) con las mismas ventajas que los SNPs aumentando la posibilidad de ser incluidos indels relacionados con el origen del individuo (AIM-INDELS), información que pudiera ser útil para encaminar la dirección de una investigación criminal en algunos países. A la fecha están disponibles para identificación humana un kit comercial (DIPlex de Qiagen) y uno no-comercial reportado en la literatura científica, lo cuales permiten el análisis relativamente sencillo de 30 y 38 INDELS, respectivamente.

²¹ SNPs, polimorfismos de un nucleótido (i.e. A→G), del inglés Single nucleotide polymorphisms.

²² SNaPshot, técnica de minisequenciación donde se pueden analizar varios SNPs simultáneamente integrando primers una posición antes del SNP, y la adición de nucleótidos ddNTPs marcados con diferentes fluorocromos que indican el alelo del polimorfismo.

²³ INDELS, inserciones-delecciones de fragmentos pequeños.

Genética clínica y molecular

REFERENCIAS

- Butler JM (2005). Forensic DNA typing. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA. p 201-240.
- Diegoli (2015) Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes. Forensic Sci Int Genet (in press)
- Jobling M, and Gill P, Nature Reviews Genetics (2004). Vol 5: 739-52. Butler JM. (2005). Forensic DNA typing. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA. p 201-240.
- Kayser & Knijff (2011) Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology, Nature Reviews 12: 179-192.

Daño al ADN ocasionado por plaguicidas

CARMEN MARTÍNEZ-VALENZUELA (1)*, STEFAN M. WALISZEWSKI (2), LUIS DANIEL ORTEGA MARTÍNEZ (3), CARLOS L. CALDERÓN VÁZQUEZ (4) ELIAKYM ARÁMBULA MERAZ (5), CECILIA ROMERO URÍAS (1)
JOSÉ HUICHAPAN MARTÍNEZ (1)

1. Instituto de Investigación en Ambiente y Salud, Universidad de Occidente, Boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional. Los Mochis, Sinaloa. México.
2. Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México
3. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla. Departamento de Ciencias Biológicas 11 poniente 2316 Colonia Barrio de Santiago. C.P. Puebla, México.
4. Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Maestría en Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y Universitarios s/n Ciudad Universitaria, 80010. Culiacán, Sinaloa, México.
5. Laboratorio de Genómica Funcional. Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR, Sinaloa. Boulevard Juan de Dios Batís paredes número 250, colonia San Joachin, Guasave Sinaloa

* Autor correspondencia. Carmen Martínez Valenzuela. Correo maria.martinezv@udo.mx.

Palabras clave: plaguicidas, ADN, Genotóxico.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son compuestos químicos, biológicamente activos, que provocan efectos adversos sobre el ambiente y la salud, estos efectos pueden tardar años en manifestarse y las personas ocupacionalmente expuestas a este tipo de compuestos constituyen el grupo de mayor riesgo.

La exposición a plaguicidas puede ocasionar neuritis, trastornos hepáticos y renales, problemas neurológicos, inmunológicos, metabólicos y endocrinos. También, se relaciona con el aumento en la incidencia de leucemias y cáncer de mama y vejiga, como consecuencia de los efectos genotóxicos de algunos de ellos (Waliszewski *et al.*, 2003; Márquez *et al.*, 2003).

Es evidente que los agentes químicos, físicos y biológicos pueden interactuar con el material genético, dando lugar a mutaciones, que están asociados a la inestabilidad genómica y al cáncer. Teniendo en cuenta esto, se requieren pruebas de genotoxicidad como parte esencial de la validación de los productos químicos. Estas pruebas incluyen ensayos *in vitro* e *in vivo* para detectar el potencial de los plaguicidas para inducir mutaciones genéticas y / o aberraciones cromosómicas (Araldi *et al.*, 2015).

El material genético de las células está continuamente expuesto al daño, la proliferación celular es particularmente vulnerable durante la replicación cromosómica en la fase de síntesis. Las horquillas de replicación se estancan como resultado de la escasez de desoxinucleótidos, o la presencia de lesiones del

Genética clínica y molecular

ADN que bloquean la progresión del replisoma, los cromosomas incompletamente replicados o dañados dan como resultado inestabilidad genómica (Palou *et al.*, 2015).

El daño al ADN, es una alteración en la estructura química, la ruptura de una de las hebras del ADN, es una forma química anormal del mismo. Algunos xenobióticos entre los que se encuentran los plaguicidas, pueden inducir modificaciones al ADN, con efectos severos en la salud humana (Poletta *et al.*, 2015).

BIOMARCADORES

Los marcadores biológicos o biomarcadores, son los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos que se producen en un sistema biológico como reflejo de la exposición a un agente tóxico (Grandjen y Bonassi, 2005). Los biomarcadores, se utilizan como indicadores del estado de salud o del riesgo a enfermedades. Son una herramienta muy útil para la evaluación del riesgo potencial a diversas exposiciones ambientales, para apoyar o rechazar el diagnóstico de un determinado tipo de intoxicación o de un efecto adverso inducido por productos químicos (Bolognesi *et al.*, 2002).

Los biomarcadores de exposición, detectan si el agente genotóxico ha penetrado en el organismo a diferentes niveles y localizan la presencia de agentes mutagénicos y/o carcinogénicos en tejidos y secreciones corporales. Si el compuesto penetró e interactuó con el material genético (mutágenos/ carcinógenos), se puede comprobar por la aparición de cambios o daño en el ADN. Un resultado positivo a este nivel, no indica necesariamente consecuencias adversas, ya que parte del daño genotóxico puede ser reversible. La ventaja de realizar este tipo de estudios, se debe a la fácil obtención de la muestra (linfocitos o desca-mación bucal). Los biomarcadores del efecto, miden el daño genético producido en el organismo a causa de una exposición. Las lesiones en el ADN, una vez producidas, pueden llegar a convertirse en cambios permanentes en las células (mutaciones). Como los efectos son permanentes, reflejan daños al ADN correspondientes a exposiciones pasadas, siendo útiles para detectar daño acumulativo.

Evaluaciones de daño genotóxico en jornaleros ocupacionalmente expuestas a plaguicidas en Sinaloa México.

La exposición ocupacional a plaguicidas se ha asociado con varias enfermedades neoplásicas. En particular se encontró un aumento significativo en la incidencia de sarcoma de tejidos blandos, el linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, el cáncer de páncreas, de la vejiga, leucemia y linfoma no-Hodgkin, problemas reproductivos y más recientemente la incidencia de la enfermedad de Parkinson (Lockwood, 2000; Ji *et al.*, 2001; Woodward, 2001; Green-Brody *et al.*, 2004; Calvert *et al.*, 2010; Araldi *et al.*, 2015).

Los estudios de biomonitorio que utilizan las células somáticas, se han realizado ampliamente para evaluar el posible riesgo genotóxico de una exposición definida y algunos indicadores, tales como aberraciones cromosómicas y anomalías nucleares las que han demostrado ser un biomarcador relevante para su posterior pronóstico de la incidencia de cáncer (Hagmar *et al.*, 1998). Además, el uso de biomarcadores adecuados en estos estudios de biomonitorización, puede proporcionar herramientas útiles para dilucidar los mecanismos de acción de la exposición.

La genotoxicidad de algunos agroquímicos puede ser mutagénica y / o cancerígena para los seres humanos, lo que lleva a la presencia de enfermedades hereditarias genéticas, carcinogénesis, disfunción reproductiva, e incluso los defectos de nacimiento (Clavel, 2007). La escisión del ADN de la cromatina en

Tópicos selectos de biomedicina

fragmentos inter-nucleosomales, es un evento celular fundamental durante el desarrollo y es crítica para la genotoxicidad inducida por agroquímicos (Li *et al.*, 2015). Un factor de riesgo primario de genotoxicidad por agroquímicos, es que actúan directa o indirectamente sobre el ADN, causando genotoxicidad crónica, evidenciada como toxicidad cancerígena y reproductiva (Xiang *et al.*, 2013).

El estado de Sinaloa, destaca a nivel nacional por la relevancia de su actividad agrícola y mantiene un liderazgo en la producción de alimentos y materias primas. Entre las estrategias de combate de plagas se ha privilegiado el uso de plaguicidas, situación que ha generado una cultura productora ligada a este tipo de insumos. La gama de los efectos de daños detectados para la salud provocados por los plaguicidas en Sinaloa, incluye lesiones agudas y persistentes sobre el sistema nervioso, pulmón y en órganos reproductores, disfunción del sistema inmunológico y endocrino. Además se vinculan como generadores de estrés oxidante y daño al ADN con efectos graves como enfermedades neurológicas, del sistema reproductor y cáncer (Muñiz *et al.*, 2008).

EXPOSICIÓN OCUPACIONAL

Las exposiciones ocupacionales a plaguicidas ocurren en agricultores, peones de campo, obreros industriales, fumigadores, trabajadores de invernaderos, entre otros, que constantemente presentan el riesgo de sufrir accidentes relacionados con estos productos). También la población en general está expuesta a través de las cadenas tróficas, al consumir alimentos contaminados por estos compuestos y al inhalar aire contaminado, por el empleo de insecticidas caseros y por dispersión en el ambiente (Pastor *et al.*, 2003).

A través de los años se ha incrementado la atención sobre la probable carcinogenicidad y mutagenicidad causada por la exposición prolongada a plaguicidas. La importancia social de las investigaciones realizadas en el ámbito de la citogenética radica en el reconocimiento temprano de factores carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos en individuos ocupacionalmente expuestos (Pastor *et al.*, 2003).

Micronúcleos y otras anormalidades nucleares

Los Micronúcleos (MN) y otras anormalidades nucleares, es el biomarcador de genotoxicidad más frecuentemente utilizado en mamíferos y actualmente se emplea en la evaluación de las consecuencias de las exposiciones ambientales y laborales a mutágenos (Norppa y Falck, 2003; Martínez *et al.*, 2015). Los MN se pueden originar de manera espontánea o como respuesta a la acción de determinados agentes clastogénicos y/o aneugénicos resultado de la pérdida durante la división celular de fragmentos cromosómicos y/o de cromosomas enteros. Los rompimientos cromosómicos darán lugar a fragmentos cromosómicos acéntricos, que al no disponer de centrómero no se incluirán en los núcleos hijos durante la división celular, al no poderse unir al huso mitótico en anafase. Estos fragmentos, se rodean de membrana nuclear y aparecen en el citoplasma como pequeños núcleos. Si el daño genotóxico ha afectado a proteínas del cinetocoro y el centrómero o al huso mitótico, lo más probable es que se produzca un retraso mitótico y un desequilibrio en la distribución de los cromosomas, provocando que queden fuera de la cinética normal de la anafase y se rodeen de envoltura nuclear, como ocurre en los fragmentos cromosómicos, originando también micronúcleos. Este ensayo puede realizarse utilizando citología exfoliativa de vejiga, de la mucosa oral y en sangre periférica, por lo que es posible aplicarlo tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Lee

Genética clínica y molecular

et al., 2002; Clare *et al.*, 2006; Bortoli *et al.*, 2009). Las células de la capa superficial del epitelio son donde aparecen cerca del 92 % de los cánceres (Rosin, 1992; Gonsebatt *et al.*, 2000).

Los MN son uno de los mejores biomarcadores para evidenciar daño cromosómico, ya que permiten detectar pérdida cromosómica que se da durante la anafase. Se usan en pruebas *in vitro* de compuestos químicos y radiaciones para determinar genotoxicidad. Asimismo, se utilizan *in vivo* para revelar la exposición a agentes genotóxicos y también para evaluar deficiencias de micronutrientes como por ejemplo: vitaminas y minerales. También, son usados para identificar enfermedades de inestabilidad cromosómica (Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

El significado biológico de los MN dependerá de la región involucrada en la ruptura de los cromosomas que se pierda. Si bien algunos rompimientos pueden provocar muerte celular, las aneuploidias tanto germinales como somáticas se relacionan con alteraciones genéticas mucho más graves implicadas en abortos espontáneos, retraso mental y cáncer (Hagmar *et al.*, 1998).

Otras anormalidades nucleares (AN)

Además de los micronúcleos, diversos cambios nucleares degenerativos han sido sugeridos como marcadores de genotoxicidad. Éstos incluyen *picnosis*, *condensación de cromatina* y *cariorrexis* que están relacionados con citotoxicidad (necrosis y queratinización), mientras que la *cariólisis* está asociada con toxicidad celular, la *cariorrexis*, *cariólisis*, *picnosis* y rompimiento de huevo se asocian con apoptosis (muerte celular programada), siendo ésta una forma de destrucción nuclear, en la cual el núcleo se desintegra por fragmentación, lo que sucede con la *cariorrexis*, pero en ésta, además, ocurre la destrucción de la membrana nuclear. La *picnosis* y el *rompimiento de huevo* son otros de los procesos nucleares que se pueden diferenciar. Los primeros presentan la cromatina más condensada, mientras que los segundos son fragmentos de material nuclear, que aún está unido al núcleo principal por un pequeño puente (Tolbert *et al.*, 1992).

Resultados del estudio desarrollado con jornaleros ocupacionalmente expuestos a plaguicidas de Sinaloa y grupo control, mediante biomarcador micronúcleos y otras anormalidades nucleares

Principales plaguicidas utilizados por el grupo expuesto

Los plaguicidas empleados en Sinaloa se presentan en la tabla 1, el grupo expuesto en este trabajo, utiliza mezclas de plaguicidas que pertenecen a los compuestos organofosforados, carbamatos, piretroides, triazinas y organoclorados entre los que se encuentran: clordano y monocrotofos prohibidos por la EPA, aldicarb y paraquat prohibidos por la Pesticide Action Network (PAN), malatión, metil azinfos, diazinón y carbaril los cuales han sido restringidos por la Unión Europea. Lo anterior indica que la mayoría de los compuestos utilizados presentan propiedades mutagénicas que potencialmente pueden generar la inducción de MN.

Tópicos selectos de biomedicina

Tabla 1. Plaguicidas utilizados en los campos de Sinaloa, México.

Grupo químico	Plaguicidas
Organoclorados	Endosulfan, Pentaclorofenol, Quintozen
Organofosforados	Clorpirifos, Dimetoato, Malatión, Monocrotofos, Metil paratión,
Carbamatos	Aldicarb, Carbofuran, Metomil, Oxamil, Benomil, Mancozeb, Tiram
Piretroides	Lambda-Cihalotrina, Cipermetrina, Deltametrina, Permetrina, Zeta-Cipermetrina
Neonicotinoides	Acetamiprida, Clothianidin, Imidacloprid, Tiametoxam
Triazinas	Ciromazina, Atrazina,
Triazoles	Difenoconazol, Epoxiconazol, Propiconazol, Tebuconazol
otros	Abamectrina, Novaluron, Sulfoxaflor, 2,4-D, Dicamba, Glifosato, Nicosulfurón, Paraquat, Azoxystrobin, Captan, Carbendazim, Carboxin, Clorotalonil, Cymoxanil, Bromuro de Metilo.

La tabla 2, muestra las frecuencias de MN siendo la frecuencia de 3.23 % en el grupo expuesto y 0.48 % en el grupo no expuesto. Al aplicar la prueba de Mann Whitney y t Student el resultado fue significativo para el grupo expuesto ($P < 0.0001$). Estos resultados con respecto a las frecuencias de MN evidencian que la exposición constante a niveles altos de plaguicidas indujo la formación de MN y anomalías nucleares en células del epitelio bucal, lo cual refleja la producción de daño. No se correlacionó el tiempo de exposición a plaguicidas con la frecuencia de MN.

Tabla 2. Frecuencias de MN detectados en células de descamación del epitelio bucal en jornaleros agrícolas expuestos a plaguicidas y grupo no expuesto.

	Grupo expuesto ^a	Grupo no-expuesto ^a	T-Student	Mann-Whiney
Individuo	% MN	% MN		
Promedio ± EE	3.23 ± 0.33	0.48 ± 0.11	0.001*	
Mediana	3.00	0.00		0.001*

Las células de exfoliación de la mucosa bucal permitieron obtener datos de otras anomalías nucleares (AN), como son las células binucleadas (presencia de dos núcleos en una célula), la cromatina condensada (agregados de cromatina), rompimiento de huevo (fragmentos de material nuclear unidos al núcleo principal por un pequeño puente), picnosis (núcleos reducidos), cariorrexis (núcleos desintegrados) y cariólisis (disolución nuclear en la cual la reacción de Feulgen es negativa y se observa como fantasma del núcleo) Tabla 3.

Tabla 3 Frecuencias de anomalías nucleares observadas en células de descamación de la mucosa bucal de los grupos expuesto y no expuesto.

Anormalidad Nuclear	Grupo Expuesto	Grupo no expuesto
Binucleadas	3.09* ± 0.11	0.80 ± 0.07
Cromatina condensada	2.63* ± 0.12	0.71 ± 0.11
Cariólisis	1.67* ± 0.11	0.69 ± 0.08
Picnosis	1.30* ± 0.10	0.54 ± 0.05
Cariorrexis	1.17* ± 0.11	0.60 ± 0.06
Rompimiento de huevo	1.19* ± 0.02	0.61 ± 0.07

* t Student Significativa $P < 0.001$. Todos los valores están expresados en medias ± E.E. de % anomalías nucleares.

Discusión

Genética clínica y molecular

En muchos países los esfuerzos por aumentar la producción agrícola, se relacionan estrechamente con el problema de las plagas que limitan la producción y a su vez requieren de la protección del cultivo desde su inicio, mediante el uso de agroquímicos especiales. Lo anterior ha incrementado la preocupación por las consecuencias y riesgos hacia la salud humana generados por la exposición ocupacional a plaguicidas y más aún, cuando es conocido que éstos, son agentes químicos tóxicos.

Los jornaleros participantes en el presente estudio, están expuestos a mezclas de plaguicidas constituidos por diferentes ingredientes activos en su mayoría organofosforados y carbamatos, algunos de ellos prohibidos por tener actividad mutagénica y carcinogénica ya demostrada (Rupa *et al.*, 1991; Falck *et al.*, 1999). Los plaguicidas pertenecientes a estos grupos son inhibidores de la colinesterasa y otras enzimas, por la afinidad que tienen al combinarse con las proteínas del plasma sanguíneo, lo que genera alteraciones en las reacciones enzimáticas, provocando que se originen derivados o formas activas que ocasionan daños al ADN (Hollingworth, 1981).

El aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos del grupo expuesto en este trabajo podría ser debido, principalmente al efecto acumulativo de los plaguicidas con acción clastogénica como el endosulfán, paraquat, paratión metílico y 2,4 D (Bull *et al.*, 2006) aunque es probable que también se manifieste actividad de otros con efecto aneugénico y citotóxico como los asociados al uso de malatión y carbosulfán (Zeljezic y Garaj-Vhrovac, 2001; Mladinic *et al.*, 2009).

La mayoría de las sustancias consideradas genotóxicas y/o carcinogénicas son altamente electrofílicas y tienen la capacidad de unirse covalentemente a moléculas biológicas como el ADN y ARN. En compuestos organofosforados como el clorpirifos, el grupo fosforilo es un sitio electrofílico potencial que puede reaccionar con el ADN y su grupo alquilo tiene la capacidad de interactuar con centros nucleofílicos de la molécula como el nitrógeno 7 de la guanina (Vindas, 2004). De este modo, el clorpirifos podría estar actuando como agente alquilante (AA). Los agentes alquilantes pueden reaccionar con centros altamente nucleofílicos del ADN (átomos de nitrógeno) o poco nucleofílicos (átomos de oxígeno). La alquilación de los oxígenos está relacionada con efectos mutagénicos y oncogénicos, mientras que la de los nitrógenos se asocia con citotoxicidad (Qiao *et al.*, 2003).

Lo anterior permite suponer que el uso frecuente e indiscriminado de este tipo de plaguicidas provoca alteraciones de ADN en los jornaleros, a pesar de que en este grupo existen personas con periodos largos y cortos de trabajo en contacto directo a plaguicidas, observándose valores similares en ambos casos como daño temprano por la exposición a sus vapores. Sin embargo, es de esperarse que los individuos con mayor tiempo de laborar con estos compuestos presenten más alteraciones y en grado más severo (Rupa *et al.*, 1988; Shaham *et al.*, 2001; Bolognesi, 2003). En este trabajo no se encontró correlación entre el tiempo de exposición y la frecuencia de micronúcleos, observando el severo daño ya en una exposición temprana.

Los MN son una de las pruebas de genotoxicidad más frecuentemente usadas para evaluar las consecuencias de las exposiciones ambientales y laborales a mutágenos (Norppa y Falck, 2003). Por ello se considera importante incluir este ensayo en la evaluación de daño genotóxico, siendo un método muy sensible, relativamente fácil de realizar y con un significado biológico claro. Este estudio, igual que otras investigaciones con trabajadores expuestos a plaguicidas refieren resultados con aumentos significativos en las frecuencias de MN con respecto a los testigos (Sailaja *et al.*, 2006). Se considera pertinente el análisis de micronúcleos en células del epitelio bucal porque cerca del 92 % de los cánceres son de origen

Tópicos selectos de biomedicina

epitelial (Rosin y Gilbert, 1990). En este estudio la frecuencia de micronúcleos en células del epitelio bucal del grupo no expuesto fue entre 0 y 1 MN en 1000 células. Estos resultados concuerdan con Stich (1987) quien reporta, que en poblaciones sanas, la frecuencia de micronúcleos en células del epitelio bucal se ubica dentro del rango de 0 a 1 por 1000 células.

Además de los MN, diversos cambios nucleares degenerativos han sido sugeridos y utilizados como marcadores de genotoxicidad. En este estudio, todas las anomalías nucleares fueron expresadas con mayor frecuencia en el grupo expuesto, que concuerda con los datos publicados por otros autores (Gómez-Arroyo *et al.*, 2000; Ergene *et al.*, 2007; Martínez Valenzuela, 2009; Jeanderson Pereira *et al.*, 2014; Martínez Valenzuela *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

La prueba de Micronúcleos y otras anormalidades nucleares en células de descamación del epitelio de la mucosa bucal, permiten concluir, que la exposición a plaguicidas representa incremento de daño al ADN, que posteriormente puede reflejarse en diferentes patologías.

REFERENCIAS

- Araldi R., Thatiana Correa de Melo, Thais Biude Mendes, Paulo Luiz de Sa Junior, Bruno Heidi Nakano Nozima, Eliana Tiemi Ito, Rodrigo Franco de Carvalho, Edislane Barreiros de Souza, Rita de Cassia Stocco. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 72, 74–82.
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543, 251-172.
- Bolognesi C., Perrone E., Landini E. (2002). Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis* 17, 391-397.
- Bonet S., Manuel I., Huguet G., Blanco I. (1985). Técnicas habituales de coloración per a secciones semi-fines de material inclós en glicol metacrilat (G.M.A.) *Scientia Gerundensis* 10, 23-32.
- Bortoli G., Barbieri de Azevedo M., Basso da Silva L. (2009). Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat. Res.* 675, 1-4.
- Bull S., Fletcher K., Boobis A., Battershill J. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis* 21, 93-103.
- Clare M., Lorenzon G., Akhurst L., Marzin D., Van Delf J., Montero R., Botta A., Berts A., Cinelli Thybaud V., Lorge E. (2006). SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test. II using human lymphocytes. *Mutat. Res.* 604, 37-60.
- Calvert M., Mehler N., Alsop J, De Vries L., Besbelli N. (2010). Surveillance of pesticide-related illness and injury in humans. In: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Krieger RI, ed). 3rd ed. New York:Elsevier, 1313–1369.

Genética clínica y molecular

- Clavel J. (2007). Progress in the epidemiological understanding of gene-environment interactions in major diseases: cancer. *C.R. Biol.* 330, 306–317.
- Falck G., Hirvonen A., Scarpato R., Saarikoski S., Migliore L., Norppa H. (1999). Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide exposed greenhouse workers. *Mutat. Res.* 441, 225-237.
- Gaikwad S., Karunamoorthy P., Kondhalkar SJ., Ambikapathy M., Beerappa R. (2015). Assessment of hematological, biochemical effects and genotoxicity among pesticide sprayers in grape garden. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 10,1-6
- Gonsebatt M., Guzman P., Blas J. (2000). Cytogenetic and cytotoxic damage in exfoliated cells as indicators of effects in humans. En: Butterworth, F.M., Gunatilaka A., Gonsebatt M. (Eds.). *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change*. Vol. 2 Plenum Press, Nueva York, pp. 317-321.
- Grandjen S., Bonassi S. (2005). Linking toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-special issue overview. *Mutat. Res.* 592, 3-5.
- Green Brody J., Ann Aschengrau, Wendy McKelvey, Ruthann A. Rudel, Christopher H. Swartz, and Theresa Kennedy (2004). Breast Cancer Risk and Historical Exposure to Pesticides from Wide-Area Applications Assessed with GIS. *Environmental Health Perspectives* 112(8), 889-897.
- Hagmar L., Bonassi S., Strombertg U., Mikoczy Z., Lando C., Hansteen IL., Montagud AH., Knudsen L., Norppa H., Reuterwall C., Tinnerberg H., Brogger A., Forni A., Hogstedt B., Lambert B., Mitelman F., Nordenson I., Salomaa S., Skerfving S. (1998). Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Mutat. Res.* 405, 171-178.
- Hollingworth R. (1981). Comparative metabolism and selectivity of organophosphates and carbamates insecticides. *Bull. WHO* 44, 155-170.
- Jeanderson Pereira Souza, Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira & José Roberto Cardoso Meireles. (2015). Chromosome damage, apoptosis, and necrosis in exfoliated cells of oral mucosa from androgenic anabolic steroids users *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78, 67–77.
- Ji T., Silverman, D.T., Stewart, P.A. et al. (2001) Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *Am. J. Ind. Med.*, 39, 92–99.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M., Kirchner S., Lorge E., Morita T., Norppa H., Surrallés J., Vanhauwaert A., Wakata A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat. Res.* 540, 153-163.
- Lee T., Allison R., O'Brien K., Naves J., Karlsson U., Wiley A. (2002). Persistence of micronuclei in lymphocytes of cancer patients after radiotherapy. *Radiat. Res.* 157, 678-684.
- Lockwood A. (2000) Pesticides and parkinsonism: is there an etiological link? *Curr. Opin. Neurol.*, 13, 687-690.
- Márquez ME., López JB., Londoño M. (2003). Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos. *IATREIA*. 16, 275 – 282.
- Martínez-Valenzuela C., Rodríguez-Quintana A., Meza E., Waliszewski S. M., Amador-Muñoz O., Mora-Romero A., Calderón-Segura M.E., Félix-Gastélum R., Rodríguez-Romero I., Caba M. (2015). Cytogenetic biomonitoring of occupationally exposed workers to ashes from burning of sugar cane in Ahome, Sinaloa, México. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40, 397–401

Tópicos selectos de biomedicina

- Mladinic M., Perkovic P., Zeljezic D. (2009). Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthylazine and carbofuran using cytome FISH assay. *Toxicol. Lett.* 189,130-137.
- Muñiz J., McCauley L., Scherer J., Lasarev M., Koshy M., Kow Y., Nazar-Stewart V., Kisby G. (2008). Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227, 97-107.
- Norppa H., Falck G. (2003). What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18, 221-233.
- Palou G, Palou R, Zeng F, Vashisht A A, Wohlschlegel JA and GQ David. 2015. Three Different Pathways Prevent Chromosome Segregation in the Presence of DNA Damage or Replication Stress in Budding Yeast. *PLOS Genetics* DOI:10.1371/journal.pgen.1005468
- Pastor S., Creus A., Parrón T., Cebulska-Wasilewska A., Siffel C., Piperakis S., Marcos R. (2003). Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 18, 249-258.
- Poletta GL, Simoniello MF, Mudry MD. 2015. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in Caiman latirostris blood. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*179:29-36. doi: 10.1016/j.cbpc.2015.08.003
- Qiao D., Seidler F., Violin J., Slotkin T. (2003). Nicotine is a developmental neurotoxicant and neuroprotectant: stage-selective inhibition of DNA synthesis coincident with shielding from effects of chlorpyrifos. *Develop. Brain. Res.* 147, 183-190.
- Rosin M. (1992). The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 267, 265-276.
- Rosin M., Gilbert A. (1990). Modulation of genotoxic effects in humans. En: Meldelsohn M.L., Albertini, R.J. (Eds.). *Mutation and Environment, Part E: Environmental Genotoxicity, Risk and Modulation.* Wiley-Liss, Nueva York, pp. 351-360.
- Rupa D., Reddy P., Sreemannarayana K., Reddi O. (1991). Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environ. Mol. Mutagen.* 18, 136-138.
- Rupa D., Rita P., Reddy P., Reddi O. (1988). Screening of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of vegetable garden workers. *Hum. Toxicol.* 7, 333-336.
- Shaham J., Kaufman Z., Gurvich R., Levi Z. (2001). Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 491, 71-80.
- Tolbert P., Shy C., Allen J. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears; methods development. *Mutat. Res.* 271, 69-77.
- Vindas R., Ortiz F., Ramírez V., Cuenca P. (2004). Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52, 601-609.
- Waliszewski S., Meza M., Infanzon R., Trujillo P., Morales M. (2003). Niveles de plaguicidas organoclorados persistentes en mujeres con carcinoma mamario en Veracruz. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 19, 59-65.
- Woodward,G. (2001) Autism and Parkinson's disease. *Med. Hypotheses*, 56, 246-249.
- Xiang G. G., Li, D.Q., Yuan, J.Z., Guan, J.M., Zhai, H.F., Shi, M.A., Tao, L.M., 2013. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. *Food Chem. Toxicol.* 53, 352-358.



Genética clínica y molecular

Zeljezik D., Garaj-Vrhovac V. (2001). Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* 16, 359-363.

Importancia del genoma mitocondrial en la salud

ELIAKYM ARÁMBULA MERAZ,¹ FRED LUQUE ORTEGA,¹ GABRIEL LÓPEZ LÓPEZ,²
ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA,¹ Y VERÓNICA J. PICOS CÁRDENAS²

¹ Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa.

² Laboratorio de Genética, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Sinaloa.

La mitocondria es un organelo citoplásmico celular que se encuentra en todas las células humanas nucleadas, engloba a un pequeño genoma circular en las células el cual es esencial para la vida, se cree que las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias que desarrollaron una relación simbiótica viviendo dentro de células más grandes.

Las mitocondrias desempeñan un papel crucial en la generación de energía metabólica en las células eucariotas. Son responsables de la mayor parte de la energía útil derivada de la degradación de los carbohidratos y de los ácidos grasos, que es convertida en trifosfato de adenosina (ATP) por el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS).^{1,2}

Para llevar a cabo esta reacción de OXPHOS, la mitocondria deberá mantener de manera intacta su estructura y función, para lo cual requiere la participación de aproximadamente 1500 genes codificados tanto en el genoma mitocondrial como en el genoma nuclear.

Mediante el ciclo de Krebs y la beta-oxidación, los carbohidratos y los ácidos grasos son oxidados para formar NADH y FADH₂, respectivamente. Los electrones de estos agentes reductores pasan a través del complejo de transporte de electrones, creando un gradiente de protones el cual es la fuerza motriz para la síntesis de ATP.

La mayoría de los pacientes con enfermedades mitocondriales tienen defectos moleculares que afectan al sistema OXPHOS mitocondrial, el cual se compone de aproximadamente 87 subunidades proteicas que forman los 5 complejos multiproteicos (complejos I-V), localizados en la membrana interna mitocondrial. De estas 87 proteínas, 13 son codificadas por el genoma mitocondrial y el resto por el genoma nuclear. Para formar los complejos OXPHOS, se requiere la participación de factores codificados en el genoma nuclear.^{3,4}

Las mitocondrias están rodeadas por un sistema de doble membrana, constituido por una membrana mitocondrial interna y otra externa separadas por un espacio intermembrana. La membrana interna forma numerosos pliegues (crestas), que se extienden hacia el interior (o matriz) del orgánulo.

Las mitocondrias contienen su propio sistema genético, el cual está separado y es distinto del genoma nuclear de la célula.

El genoma mitocondrial está constituido por moléculas circulares de ADN de doble cadena de 16,569 pb, presentes en varias copias por orgánulo, codifica para 13 proteínas implicadas en el transporte de electrones y en la OXPHOS. Además, el ADN mitocondrial (ADNmt) humano codifica para 2 ARN riboso-

Genética clínica y molecular

mal (ARNr); ARNr 16S y 12S y 22 ARN de transferencia (ARNt) que se requieren para la traducción de las proteínas codificadas por el genoma mitocondrial.^{1,2,4}

El tipo de herencia del sistema genético mitocondrial, su localización en un organelo citoplasmático, la disposición continua de los genes sin nucleótidos intermedios ni intrones y la poliplasmia (alto número de copias en cada célula) proporcionan caracteres genéticos que los diferencian claramente de los del ADN nuclear. Cada célula contiene entre unas 1,000 y 10,000 copias de ADNmt dependiendo del tejido, pasando por unos cuantos cientos en los espermatozoides y hasta unas 100,000 en el oocito. El ADNmt está localizado en discretos nucleoides en la matriz mitocondrial interna y contiene de 1 a 2 copias.^{3,4,5}

El ADNmt se hereda por vía materna con un patrón vertical no mendeliano. La madre transmite su genoma mitocondrial a todos sus hijos, pero solamente las hijas lo pasarán a todos los miembros de la siguiente generación y así sucesivamente. Esto se debe al elevado número de moléculas de ADNmt que existe en los óvulos en comparación con unos pocos cientos que hay en los espermatozoides. Además, las mitocondrias que puedan entrar en el óvulo fecundado se eliminan por un proceso activo.^{3,7}

El fenotipo de una línea celular puede variar durante la división celular debido a que las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas, por lo que si en una célula coexisten dos poblaciones de ADNmt, una normal y otra mutada (heteroplasmia), a lo largo de las divisiones se podrán generar tres genotipos diferentes: homoplásmico para el ADNmt normal, homoplásmico para el ADN mutado y heteroplásmico. Por tanto, el fenotipo de una célula con heteroplasmia dependerá del porcentaje de ADN mutado que contenga. Si el número de moléculas de ADNmt dañado es relativamente bajo se produce una complementación con las moléculas de ADN normal y no se manifestará el defecto genético. Cuando el ADN mutado sobrepasa un umbral determinado se manifestará un fenotipo patogénico (efecto umbral), es decir, si la producción de ATP llega a estar por debajo de los mínimos necesarios para funcionamiento de los tejidos, debido a la producción defectuosa de proteínas codificadas en el ADNmt, se produce la aparición de la enfermedad. El número de moléculas de ADN es diferente en cada órgano y tejido según la cantidad de energía requerida para su funcionamiento. Por ello, los tejidos que preferentemente se afectan son la visión, el sistema nervioso central, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos, riñón e hígado.^{3,6}

El ADNmt es susceptible a daño oxidativo debido a su cercanía al sitio donde se producen las especies oxígeno reactivas (ROS), debido a la ausencia de proteínas histonas protectoras y al sistema de reparación limitado de las mitocondrias.

El genoma mitocondrial se caracteriza por una evidente inestabilidad, con una tasa estimada de mutaciones de al menos 5 a 15 veces mayor que en el genoma nuclear, esta alta tasa de mutación determina el alto nivel de variabilidad del ADNmt así como la aparición de mutaciones somáticas durante el envejecimiento. Este fenómeno puede estar causado porque en la mitocondria se producen continuamente radicales oxígeno, como consecuencia de la oxidación final de los compuestos carbonados, que pueden dañar a un ADN que no está protegido por proteínas. Debido a este hecho, la variación de secuencias entre individuos de una misma especie es muy grande, hasta unos 70 nucleótidos, y en un mismo individuo se estará generando, a lo largo de la vida, una pequeña heterogeneidad en el ADNmt. De este modo, se ha llegado a proponer que la disminución en la capacidad respiratoria de los tejidos que tiene lugar en el envejecimiento pueda ser debida a una acumulación de este daño mitocondrial.⁶

Tópicos selectos de biomedicina

Han pasado más de cinco décadas desde que Luft en 1962 describiera las anomalías mitocondriales y del metabolismo energético, y Gottfried Schatz de la Universidad de Basilea, Suiza, descubriera en 1963 el ADNmt. Durante años no hubo avance significativo en esta área; fue hasta la última década del siglo pasado cuando se describió la existencia de la delección y mutación del ADNmt que conduce a una expresión clínica y fenotípica variada, comúnmente con manifestación multisistémica.

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de trastornos que están producidos por un fallo en el sistema de fosforilación oxidativa, la ruta final del metabolismo energético mitocondrial, con la consiguiente deficiencia en la biosíntesis del ATP.¹⁻⁴

Es uno de los grupos más comunes de enfermedades genéticas con una prevalencia de más de 1 en 5000 en adultos y puede ser causada por mutaciones ya sea en el ADNmt o genes nucleares que directa o indirectamente interfieren con la función de la cadena respiratoria mitocondrial.⁴

SÍNDROMES RELACIONADOS CON MUTACIONES EN EL ADN MITOCONDRIAL

Debido a que las mitocondrias son componentes vitales de todos los tipos de células, estas enfermedades son generalmente multisistémicas y las manifestaciones clínicas muy variadas con solapamiento entre diversos síndromes. Prácticamente pueden afectar a casi cualquier órgano o tejido, pero fundamentalmente a aquellos que más dependen de la energía mitocondrial como son el sistema nervioso y el músculo cardiaco y estriado.⁸ Sin embargo, algunas enfermedades mitocondriales se caracterizan justo por lo contrario, por la afectación de un tejido único como el nervio óptico en la neuropatía óptica hereditaria de Leber o las células cocleares en la sordera mitocondrial. De cualquier forma, una asociación de síntomas implicando órganos no relacionados puede ser un primer indicio de patología mitocondrial.⁸

En algunos casos es posible asignar una serie de síntomas a síndromes determinados pero, en general, no se puede delimitar con precisión porque el solapamiento de síntomas es muy frecuente y el curso y gravedad de los mismos varía en los diferentes individuos. Otras veces, principalmente en niños, los síntomas no están bien desarrollados y es muy difícil asociarlos a un síndrome determinado.⁸

Prácticamente, cualquier síntoma o constelación de síntomas relacionados con afectación de cualquier sistema, órgano o tejido puede ser reflejo de disfunción mitocondrial, siendo especialmente sugerentes los hechos siguientes.^{8,9}

1. Evidencia de trastorno multistémico progresivo, que afecte en proporción y cronología variable al SNC, sistema nervioso periférico, ojos, audición, musculatura estriada y corazón.
2. Oftalmoplejía externa progresiva, en especial si va asociada a retinitis pigmentaria.
3. Asociación de polimioclonías y ataxia.
4. Existencia de ataxia cerebelosa con trastornos sensoriales propioceptivos.
5. Debilidad muscular e intolerancia al ejercicio asociada a un síndrome neurológico.
6. Episodios neurológicos recurrentes y parcialmente progresivos (*stroke-like*), tales como hemiparesia, hemianopsia, ceguera cortical o migraña.
7. Síndrome de talla baja y déficit de audición progresivo.
8. Síndrome de Kearns-Sayre

Genética clínica y molecular

El síndrome de Kearns-Sayre es una enfermedad neuromuscular mitocondrial caracterizada por la aparición antes de los 20 años de oftalmoplejía externa, ptosis y retinitis pigmentaria. La enfermedad comienza a menudo con característicos síntomas oculares, seguidos de la aparición progresiva de otros signos, dependiendo de la distribución en los tejidos de la anomalía molecular. Los síntomas asociados más frecuentemente incluyen sordera, afectación cardíaca (miocardiopatía, defecto de conducción cardíaca), afectación cerebral (ataxia, proteínas elevadas en líquido cefalorraquídeo, déficit cognitivo), miopatía esquelética, trastornos intestinales, déficit hormonal (hipoparatiroidismo, diabetes) e insuficiencia renal¹⁰. La enfermedad progresa lentamente, con aparición de nuevos síntomas y empeoramiento lento de los síntomas previos. El síndrome de Kearns-Sayre está causado por deleciones de grandes porciones del ADNmt (cuadro 1). El umbral depende del órgano; aproximadamente un 60 % para el músculo estriado esquelético. La mayoría de casos de síndrome de Kearns-Sayre son esporádicos. De hecho, las deleciones del ADNmt sólo se transmiten excepcionalmente de una generación a la siguiente. El diagnóstico se debe sospechar por el cuadro clínico y la presencia de alteraciones morfológicas típicas en el músculo esquelético (fibras que presentan proliferación mitocondrial o «fibras rojas rasgadas» y fibras con déficit de citocromo c oxidasa).^{8,9}

SÍNDROME DE ENCEFALOMIOPATÍA MITOCONDRIAL CON ACIDOSIS LÁCTICA Y EPISODIOS DE ACCIDENTES CEREBRO-VASCULARES (MELAS)

El síndrome de MELAS, está caracterizado por encefalomiopatía, acidosis láctica, y por accidentes cerebro-vasculares recurrentes y transitorios, producidos a edad temprana, que provocan una disfunción cerebral subaguda y cambios en la estructura cerebral con acompañamiento de hemiparesis y ceguera cortical. Además, otros caracteres comunes son: convulsiones generalizadas, migraña, sordera, demencia, vómitos, debilidad en las extremidades.¹⁰⁻¹² La biopsia muscular suele presentar fibras rojo-rasgadas. Este síndrome está causado, en más del 80% de los casos, por la mutación A3243G localizada en el gen tARN-Leu (UUR) (cuadro 1), pero también se han encontrado otras mutaciones en el mismo tARN, y alguna en genes codificantes de proteínas del complejo I.^{8,12,13} Todas las mutaciones están en forma heteroplásmica y presentan una clara herencia materna aunque raramente más de un miembro de la familia está afectado.¹²

SÍNDROME DE EPILEPSIA MIOCLÓNICA CON FIBRAS ROJO-RASGADAS (MERRF)

El síndrome de MERRF se caracteriza por los siguientes caracteres clínicos: epilepsia mioclónica, debilidad muscular, ataxia, convulsiones generalizadas y miopatía mitocondrial con presencia de fibras rojo-rasgadas no reactivas a la citocromo c oxidasa. Otros síntomas menos comunes que pueden acompañar a los anteriores son: demencia, sordera, neuropatía, atrofia óptica, fallo respiratorio, cardiomiopatía, y algunos pacientes tienen lipomas múltiples en cuello y tronco.⁸ Puede aparecer tanto en la infancia como en adultos y es de curso progresivo. La mayoría de los casos de MERRF (80 %) están causados por la mutación A8344G localizada en el gen del tARNLys (cuadro 1), pero también se han encontrado otras

Tópicos selectos de biomedicina

mutaciones más minoritarias en el mismo gen. Todas las mutaciones están en forma heteroplásmica y el porcentaje de ADNmt dañado varía entre individuos.^{8,9}

Pronóstico:

Aunque habitualmente constituyen procesos degenerativos, pueden tener un curso crónico estacionario, en forma de manifestaciones neurológicas recurrentes e incluso mostrar una mejoría espontánea hasta la recuperación, como ocurre con el déficit benigno de COX (tinción de citocromo c oxidasa). El tratamiento en general no consiste mas que en un enlentecimiento del proceso natural, con algunas excepciones entre las que se encuentran procesos primarios de deficiencia en CoQ₁₀ o carnitina.^{8,9}

CUADRO 1.- Mutaciones más frecuentes en el ADN mitocondrial y enfermedades asociadas¹⁴

Enfermedad	Mutación	Gen
MELAS	A3243G	tARNLeu(UUR)
	Hot spot	tARNLeu(UUR)
MERRF	A8344G	tARNLys
	Hot spot	tARNLys
Kearns-Sayre	Delección única	Varios genes
NARP	T8993G/C	ATP6
Leigh (MILS)	T8993G/C	ATP6
	T9176G/C	ATP6
LHON	G3460A	ND1
	G11778A	ND4
	T14484C	ND6
Diabetes y Sordera	A3243G	tARNLeu(UUR)
Sordera neurosensorial	Hot spot	tARNSer(UCN)
Sordera no sindrómica inducida por aminoglicosidos	A1555G	rARN 12S
Pearson	Delección única	Varios genes
CPEO	Delección única	Varios genes
	Delecciones múltiples	Varios genes
MNGIE	Delecciones múltiples	Varios genes
Síndromes de depleción	Disminución del número de copias de mtADN	Mutaciones en genes nucleares

MELAS: Encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebro vasculares; MERRF: Epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas; NARP: Neuropatía Ataxia y retinitis pigmentosa; MILS: Síndrome de Leigh de herencia materna; LHON: Neuropatía óptica hereditaria de Leber; CPEO: Oftalmoplejia progresiva externa crónica; MNGIE: Encefalopatía mitocondrial neurogastrointestinal. Tomada de A Human Mitochondrial Genome Database <http://www.mitomap.org>.¹⁴

Genética clínica y molecular

REFERENCIAS

1. Geetha, R.V., *et al.*, Mitochondrial DNA and Inherited Diseases - A Comprehensive Review. *Drug Invention Today*, 2011. 3(9): p. 221-226.
2. Wong, L.J., Molecular genetics of mitochondrial disorders. *Dev Disabil Res Rev*, 2010. 16(2): p. 154-62.
3. Solano, A., *et al.*, Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud Pública de México*, 2001. 43: p. 151-161.
4. Ng, Y.S. and D.M. Turnbull, Mitochondrial disease: genetics and management. *J Neurol*, 2015.
5. Poulton, J., *et al.*, Transmission of mitochondrial DNA diseases and ways to prevent them. *PLoS Genet*, 2010. 6(8).
6. Sobenin, I.A., *et al.*, Mitochondrial Aging: Focus on Mitochondrial DNA Damage in Atherosclerosis - A Mini-Review. *Gerontology*, 2015. 61(4): p. 343-9.
7. Stewart, J.B. and N.G. Larsson, Keeping mtDNA in shape between generations. *PLoS Genet*, 2014. 10(10): p. e1004670.
8. Thornton B., Cohen B., Copeland W., Maria L.B. Mitochondrial Disease: Clinical Aspects, Molecular Mechanisms, Translational Science, and Clinical Frontiers. *J Child Neurol*, 2014. 29(9). p. 1179-1207.
9. Gorman G.S., *et al.*, Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol*, 2015. 77(5); 753-9.
10. Domínguez-Aburto L.J.E., Huesca Hernández Fabiola. Enfermedades de herencia mitocondrial que cursan con sordera. *An ORL MEX*, 2007. 52(3); p.102-10.
11. Takeshi Y., *et al.*, MELAS and rReversible Vasoconstricción of the Major Cerebral Arteries. *Int Med*, 2013. 52; p. 1389-92.
12. Tan A.L.W., Goy R. Anaesthetic Management of a Patient with Leigh's Syndrome with Central Hypoventilation and Obstructive Sleep Apnoea. *Singapore Med J*, 2013. 54(12); p. e250-3.
13. El-Hattab A.W., Adesina A.M., Jones J., Scaglia F. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab*, 2015. 116(1-2); p 4-12.
14. MITOMAP. Lista actualizada de mutaciones asociadas a distintos fenotipos. Revisada en Septiembre de 2015. A Human Mitochondrial Genome Database <http://www.mitomap.org>.



Hematología y oncogenética

Cáncer hereditario. Experiencias en Cuba

MARTHA SONIA ROBAINA CASTELLANOS

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, La Habana, Cuba.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento y proliferación celular es un proceso regulado genéticamente que conlleva muchos eventos coordinados que garantizan el correcto crecimiento celular. El cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células formando un tumor o neoplasia y la posterior adquisición, por parte de estas células de capacidad invasiva permitiéndoles migrar desde su lugar de origen a otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis.¹ Para entender o estudiar la carcinogénesis hay que tener en cuenta su alta complejidad, la cual se refleja en la gran heterogeneidad y variabilidad morfológica y pronóstico de los tumores y el gran número de alteraciones moleculares oncogénicas descritas. Éstas seguirán aumentando conforme se avance en el conocimiento de nuevas moléculas o nuevas funciones de moléculas ya conocidas, cuya activación o inactivación puedan afectar a los procesos de proliferación y diferenciación celular, ya sea a nivel del ciclo celular, a nivel de apoptosis etc. Entonces podemos decir que el cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento incontrolado de un grupo de células del organismo. Los diferentes tipos de cáncer en su mayoría se deben a un proceso de envejecimiento y factores ambientales; sin embargo, entre el 5 y 10 % de los casos de cáncer diagnosticados se deben a factores hereditarios transmitidos de padres a hijos.²

La historia del cáncer hereditario comenzó con las observaciones de agrupaciones familiares de pacientes que a menudo manifestaron fenotipos exóticos y peculiares, tales como el tipo que puede manifestarse en formas graves de neurofibromatosis. El extraño aspecto de algunos miembros de la familia, hizo que frecuentemente sus médicos e incluso los propios miembros de dicha familia afectados, consideraran que su destino era una maldición de Dios. Una interpretación científica de la etiología fue desarrollada en la era de la medicina moderna, cuando los médicos y los genetistas empezaron ya a considerar que las causas se debían a factores biológicos o genéticos.

Se pueden definir los cánceres hereditarios como aquellos tumores que están causados por mutaciones (cambios o transformaciones en la información genética) en línea germinal, que a diferencia de las mutaciones somáticas, puede transmitirse a la descendencia. Sólo un 5 % de todos los cánceres se pueden considerar hereditarios y casi todos se transmiten mediante un patrón de herencia autosómica dominante.³ Esta susceptibilidad implica un riesgo aumentado respecto a la población general de desarrollar cáncer, que dependiendo del síndrome que consideremos variará en función de su penetrancia.

Por otro lado, la aparición de varios cánceres en el seno de una familia no siempre se asocia a la presencia de una mutación de riesgo, sino que la agregación familiar puede ser debida a factores ambientales:

Hematología y oncogenética

exposición a agentes cancerígenos compartida por los miembros de la familia o estilos de vida semejantes que incrementen el riesgo. Por tanto, no toda agregación familiar de casos de cáncer equivale a un síndrome de predisposición hereditaria.

DESARROLLO

El cáncer comienza en una célula. La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión pre cancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y agentes externos a los que se expone durante su vida. El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta muchísimo con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo para determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad. Como hemos visto, su etiología está relacionada tanto con factores internos (mutaciones hereditarias, condiciones inmunes, ambiente hormonal y mutaciones causales) y externos (tabaco, sustancias químicas, radiaciones y agentes infecciosos). Estos factores causales pueden actuar conjuntamente o secuencialmente para iniciar o promover la carcinogénesis

Aproximadamente un 5-10% de todos los cánceres tiene una base hereditaria. Esto se debe a que el individuo nace con una mutación en línea germinal que le predispone a una mayor susceptibilidad para desarrollar un tumor. Dentro de este rango se engloban todos los síndromes de predisposición al cáncer (SPCs). El cáncer hereditario es consecuencia de mutaciones en los proto-oncogenes, genes supresores de tumores o genes encargados de la reparación, integridad o estabilidad del ADN. En la mayoría de los casos las mutaciones en estos genes son altamente penetrantes. Se suele heredar una copia mutada de uno de estos genes, si bien esta circunstancia no es suficiente para el desarrollo del tumor. El cáncer sólo llegará a manifestarse tras la acumulación de nuevas mutaciones somáticas. Es decir, en la mayoría de los SPCs se hereda la predisposición a desarrollar cáncer de acuerdo a patrones mendelianos. Han sido descritos alrededor de 200 síndromes de susceptibilidad hereditaria a padecer cáncer, heredándose la mayor parte de ellos de un modo autosómico dominante.⁴

Los avances en Genética Humana que han ocurrido durante los últimos años han revolucionado nuestros conocimientos sobre el rol de la herencia en la salud y la enfermedad. El genoma no sólo determina la causa de enfermedades monogénicas que afectan a muchas personas en todo el mundo, sino también dependiendo de factores ambientales incrementa el riesgo para las llamadas enfermedades comunes. Uno de estos avances lo constituye precisamente el descubrimiento de los oncogenes y los genes supresores tumorales que han revolucionado la Oncología con el esclarecimiento de las bases genéticas de determinados tipos de cáncer.

También se debe hacer mención sobre una entidad poco conocida como es la agregación familiar de cáncer. Este es un subgrupo de moderado-alto riesgo donde no se cumplen de manera estricta los criterios definidos para el denominado cáncer hereditario, sin embargo suele ser mucho más frecuente que el cáncer hereditario.

Tópicos selectos de biomedicina

En estas familias el manejo es mucho más problemático, ya que no se les puede dar una valoración de riesgo tan fiable como en el caso del cáncer hereditario, no se dispone de un test genético adecuado que ofrecer, ni tampoco se sabe hasta dónde pueden llegar las recomendaciones sobre el manejo de ese riesgo aumentado de cáncer.

El diagnóstico y el consejo genético en cáncer son procedimientos que se utilizan para diagnosticar una predisposición hereditaria al cáncer antes de que éste aparezca y, una vez confirmado el diagnóstico genético, para intervenir precozmente evitando la aparición de dicho cáncer o diagnosticándolo precozmente en una fase curable.⁵

De una forma muy resumida, el proceso se inicia cuando un profesional cualificado, recoge inicialmente los antecedentes personales y familiares (árbol genealógico) y valora el riesgo de cáncer. Con posterioridad se proporcionará una educación genética, se discutirá el riesgo individual y se ofrecerá la posibilidad de realización del test genético, si se considera apropiado. Finalmente, se comunicarán los resultados del test genético, y se recomendarán las medidas preventivas más adecuadas.

Cuando no se conoce la alteración genética responsable del cáncer en la familia, todas las personas a riesgo (habitualmente los parientes en primer grado de los afectados), estarán en vigilancia médica estrecha. Conocer la mutación familiar tiene ventajas, pues el seguimiento quedará restringido a los miembros de la familia que resultaron ser portadores de la alteración.⁶

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓN AL CÁNCER

1. Edad de aparición del cáncer más temprana.
2. Alta incidencia de cáncer en la familia.
3. Transmisión del mismo tipo de cáncer.
4. Bilateralidad en órganos pares.
5. Multifocalidad.
6. Aparición de varios cánceres en el mismo individuo.
7. Asociación del cáncer con defectos del desarrollo

OBJETIVO DE LA ATENCIÓN AL CÁNCER HEREDITARIO

Reducir la morbilidad y la mortalidad en individuos con predisposición genética a padecer cáncer mediante la identificación de tales individuos antes que se desarrolle el cáncer, facilitándoles un programa completo de prevención, detección precoz y tratamiento.

SOSPECHA CLÍNICA DE CÁNCER HEREDITARIO

Las características clínicas relacionadas con la forma de aparición, edad de diagnóstico y antecedentes familiares permiten orientar el caso en estudio y son herramientas fundamentales para la derivación de

Hematología y oncogenética

pacientes hacia una consulta de evaluación y caracterización más exacta del riesgo. Éstas son importantes pautas de alarma para todo profesional dedicado al manejo del cáncer en cualquiera de sus aspectos.⁵

¿CÓMO SE ESTABLECE EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER HEREDITARIO?

1. Determinación masiva de mutaciones germinales por técnicas de genética molecular en la población general. ESTUDIOS MUY COSTOSOS
2. Estudio de la familia: establecer historia familiar, construcción de árboles genealógicos, identificación de los miembros con riesgo. ALTERANATIVA POSIBLE

Existen datos obtenidos por interrogatorios que nos permiten sospechar la presencia de un cáncer hereditario. Con esta información, se orienta a la familia sobre la necesidad de algún estudio genético y/o evaluaciones clínicas selectivas periódicas (Hernández, Dimas E., 2008). En nuestra exposición haremos mención de los criterios a tener en cuenta para definir la sospecha clínica del carácter hereditario en las localizaciones más frecuentes, sin embargo, por su relevancia, en esta versión resumida nos referiremos a las dos más frecuentes: mama y colon.

La mayoría de los cánceres de mama se desarrollan en mujeres sin antecedentes familiares y se consideran por ello esporádicos, sin embargo de un 15 a un 20 % de los cánceres de mama se asocian a antecedentes familiares aunque se desconoce en qué medida esta agregación familiar es fruto del azar, de una susceptibilidad genética, de determinados factores ambientales o de alguna combinación de todos estos factores. En estos casos hablamos de cáncer de mama familiar. Por otro lado, alrededor de un 5-10 % de los cánceres de mama se atribuyen a mutaciones por línea germinal en genes de herencia autosómica dominante con penetrancia completa como son BRCA 1 y BRCA 2, en estos casos hablamos de cáncer de mama hereditario. Generalmente estos casos de cáncer de mama se reconocen por aparecer a edades muy tempranas y/o estar asociados a antecedentes familiares muy importantes (Pérez Segura, P y col, 2004).

CRITERIOS CLÍNICOS DE CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO/FAMILIAR⁷

Criterios de alto riesgo

1. Un caso de cáncer menor o igual a 40 años.
2. Diagnóstico de cáncer de mama y ovario en un mismo individuo.
3. Dos o más casos de cáncer de mama, uno de los cuales es menor de 50 años o bilateral.
4. Un caso de cáncer de mama menor o igual a 50 años o bilateral y un caso de cáncer de mama familiar de I o II grado.
5. Tres casos de cáncer de mama y ovario (al menos un caso de ovario) en familiares de I o II grado.
6. Dos casos de cáncer de ovario en familiares de I y II grado.
7. Un caso de cáncer de mama en hombre y familiar de I y II grado con cáncer de mama u ovario.

Tópicos selectos de biomedicina

Criterios de moderado riesgo

1. 2 familiares en I grado si ambos se han diagnosticado entre los 51 y 60 años.
2. 1 familiar en I y II grado (madre o hermana y tía materna o abuela materna), si la suma de sus edades es menor o igual a 118 años.

Asociadas a otros tumores

1. Síndrome de Li Faumeni
2. Síndrome de Cowden (PTEN)
3. Síndrome de Peutz Jeghers

Otra de las localizaciones más importantes desde el punto de vista de los síndromes hereditarios, lo constituye el cáncer colorrectal, que tiende a constituirse como segunda causa de muerte por cáncer con unas tasas cada vez más semejantes a las que se recogen del cáncer de mama en las mujeres. En algunos casos se han descrito mutaciones en genes concretos, como en el cáncer de colon hereditario no polipósico o la poliposis adenomatosa familiar. No obstante, muchos cánceres familiares continúan siendo una incógnita. La mayoría de los síndromes hereditarios de cáncer obedecen a un patrón de herencia autosómica dominante, es decir, que sólo es necesario una copia de un alelo; y que, por lo tanto, cada hijo tiene un 50 % de probabilidades de heredar la mutación. La penetrancia de estas mutaciones es con frecuencia incompleta y, por tanto, algunos individuos a pesar de ser portadores de la mutación no padecerán cáncer. Por el contrario, sólo unos pocos síndromes raros obedecen al modelo hereditario recesivo, y en una pequeña proporción de casos las mutaciones aparecen de Novo, y se transmiten posteriormente a la descendencia. En el caso del colon, debemos decir que cuando hablamos de cáncer familiar colorrectal nos referimos a la presencia de tumores de colon en varias personas emparentadas de I y II grado sin seguir un patrón mendeliano. En la etiología del cáncer familiar pueden influir tanto factores genéticos (genes de baja susceptibilidad) como ambientales. Representan aproximadamente entre el 15 y el 20% de todos los tumores de colon. El cáncer hereditario es el que se desarrolla sobre una base de predisposición genética, es decir, la presencia de una mutación en la línea germinal que predispone al individuo a una mayor susceptibilidad para desarrollar un determinado tumor. La mayoría de los síndromes hereditarios con predisposición al cáncer colorrectal obedecen también a un patrón de herencia autosómico dominante, no obstante, la penetrancia de algunos de estos genes es incompleta y algunos individuos portadores de la mutación no padecen la enfermedad; sólo unos pocos síndromes infrecuentes obedecen al modelo hereditario recesivo.

Hematología y oncogenética

CRITERIOS CLÍNICOS PARA IDENTIFICAR RIESGOS DE CCHNP

Criterios de Ámsterdam I⁸

Al menos tres familiares con confirmación histológica de cáncer colorrectal

1. Uno debe ser familiar de I grado de los otros dos.
2. Al menos dos generaciones sucesivas deben estar afectadas.
3. Al menos uno de los familiares afectos de cáncer colorrectal debe haber sido diagnosticado antes de los 50 años.
4. La Poliposis adenomatosa familiar debe haberse excluido.

Criterios de Ámsterdam II⁹

Al menos tres familiares afectos de cáncer asociado con CCHNP (colorrectal, endometrio, estómago, ovario, uréter o pelvis renal, cerebral, intestino delgado, vía biliar o piel)

1. Uno debe ser familiar de I grado de los otros dos.
2. Al menos dos generaciones sucesivas deben estar afectadas.
3. Al menos uno de los familiares con cáncer asociado a CCHNP debe haber sido diagnosticado antes de los 50 años.
4. La Poliposis adenomatosa familiar debe haberse excluido.
5. Los tumores deben ser confirmados cuando sea posible.

Criterios de Bethesda¹⁰

1. Individuos con cáncer en familias que cumplan criterios de Amsterdam.
2. Individuos con dos tumores relacionados con CCHNP, incluyendo cáncer color rectal sincrónico y metacrónico o cánceres extracolónicos asociados.
3. Individuos con cáncer colorrectal y un pariente de primer grado con cáncer color rectal y/o tumores extracolónicos relacionados con CCHNP y/o un adenoma color rectal, uno de los cánceres diagnosticado antes de los 45 años, y el adenoma diagnosticado antes de los 40 años.
4. Individuos con cáncer color rectal o cáncer de endometrio diagnosticado antes de los 45 años.
5. Individuos con cáncer colorrectal derecho con formas histológicas poco diferenciadas (sólidos/cribiforme) diagnosticado antes de los 45 años.
6. Individuos con cáncer colorrectal con células en anillo de sello diagnosticado antes de los 45 años.
7. Individuos con adenomas diagnosticados antes de los 45 años.

Tópicos selectos de biomedicina

Las distintas estrategias de prevención están orientadas a disminuir el riesgo de aparición de cáncer (prevención primaria) o a realizar una vigilancia de alto riesgo (prevención secundaria), desde edades más tempranas y a intervalos frecuentes. Estas estrategias deben estar dirigidas a todas las localizaciones de cáncer según el síndrome responsable del cuadro.

La prevención primaria implica por ejemplo la realización de mastectomía o colecto mía profiláctica o quimioprevención con drogas. Estas alternativas son decisiones individualizadas, consensuadas entre pacientes y médicos tratantes.

La prevención secundaria incluye la detección precoz, mediante más de una técnica de imágenes de alta sensibilidad, utilizadas desde edades tempranas (25 años) y a intervalos frecuentes (anual o bianual según el caso).

Además del manejo preventivo particular de cada Síndrome de Cáncer Hereditario, pueden utilizarse medidas preventivas empíricas basadas en los antecedentes familiares de cáncer y los riesgos calculados.

La evaluación de riesgo y asesoramiento genético permite identificar individuos y familias en riesgo de poseer cáncer familiar o hereditario, abarcando la complejidad de los aspectos médicos, psico-sociales y éticos que caracterizan a estos casos; para ello, profesionales especializados en el área de la genética oncológica trabajan en conjunto con un equipo médico multidisciplinario. Uno de los principales objetivos de este proceso como ya hemos dicho es determinar la causa de los casos de cáncer observados en la familia, categorizando así el riesgo y adecuando las estrategias de prevención (primaria o secundaria), según el riesgo evaluado.⁵

EXPERIENCIAS EN CUBA EN LA ATENCIÓN AL CÁNCER HEREDITARIO

En Cuba, el cáncer ha sido históricamente una de las primeras causas de muerte; ya en 1910 se situaba en el octavo lugar de la lista y desde 1958 se ubicó como la segunda causa hasta 2011¹¹ sólo precedida por las enfermedades cardiovasculares y actualmente es la primera causa de muerte en Cuba.^{1,2}

En el Instituto Nacional de Oncología de Cuba (INOR) se estableció en Febrero de 2008 un servicio de asesoramiento genético a pacientes y familiares con cáncer hereditario que se nutre de profesionales con perfiles diferentes de la Medicina, pero todos relacionados con enfermedades oncológicas; este servicio tiene como principal objetivo mejorar la detección, manejo y prevención de grupos de alto riesgo de cáncer en Cuba, mediante la implementación de iniciativas que lleguen a tumores de alta prevalencia con medidas de prevención efectivas que causen un impacto en la situación de la enfermedad en la población (Robaina Castellanos, M. S. y col, 2008) a partir de la capacitación de dichos profesionales para conformar grupos multidisciplinarios de manejo de pacientes de alto riesgo y la difusión en la comunidad de la importancia del tema y sus implicancias.

El registro de familias afectadas y las recomendaciones unificadas de prevención son herramientas fundamentales que contribuyen con los logros propuestos.

Durante la evaluación es necesario recabar información individual y familiar del caso, decidir la realización de un estudio genético de acuerdo a los criterios clínicos observados y sugerir la mejor estrategia preventiva para ese grupo familiar expuesto.

Hematología y oncogenética

CLASIFICACIÓN DE LAS FAMILIAS SEGÚN EL RIESGO⁵

Familias de alto riesgo:

1. Familias que cumplen los criterios diagnósticos clínicos publicados para un síndrome de susceptibilidad al cáncer.
2. Familias que tienen una probabilidad mayor que el 10% de tener una mutación germinal en un gen de susceptibilidad y, en consecuencia, son candidatas al estudio genético.
3. Recomendable la consulta de Genética del Cáncer y medidas especiales de vigilancia de los órganos diana.

Familias de riesgo moderado:

1. Familias que tienen un riesgo relativo igual o mayor que 2.0 para desarrollar un cáncer concreto, pero que no cumple los criterios clínicos de ningún síndrome de predisposición específico.
2. Recomendable medidas especiales de vigilancia de los órganos diana (de aquellos órganos donde las medidas de cribado sean de eficacia demostrada)

Familias de riesgo bajo:

1. Por defecto, el resto.
2. No recomendable medidas especiales de seguimiento, sólo las aconsejables en la población general (cáncer de cérvix, endometrio, cáncer de piel).

ESTRATEGIA CUBANA EN LA ATENCIÓN AL CÁNCER HEREDITARIO

1. Creación de un servicio de asesoramiento genético en Oncología.
2. Consultas de asesoramiento genético para el cáncer hereditario.
3. Registros de familias con alto y moderado riesgo para el cáncer de mama, colon, próstata, retinoblastoma y otros tumores de la infancia.
4. Consultas multi e interdisciplinarias.
5. Investigaciones conjuntas con otras instituciones nacionales y extranjeras.
6. Cursos sistemáticos de actualización.
7. Educación a la población.

Consultas de asesoramiento genético en Oncología

- confección del árbol genealógico

Tópicos selectos de biomedicina

- Estimación del riesgo para otros miembros de la familia.
- Identificación de familiares de riesgo
- Extracción de ADN para estudios moleculares (Banco de ADN)
- Seguimiento de propósitos y familiares de riesgo
- Actualización del Registro de familias con cáncer hereditario por localizaciones.
- Consultas multidisciplinarias

REGISTROS DE CÁNCER HEREDITARIO

En nuestro servicio contamos con un registro de cáncer heredo familiar de todas las provincias del país según las diferentes localizaciones con sus correspondientes árboles genealógicos que periódicamente son actualizados.

ACCIONES DESARROLLADAS POR EL SERVICIO DE ONCOGENÉTICA DE CUBA

1. Integración a la Red Nacional de Genética Médica de Cuba.
2. Creación del Manual de Organización de procedimientos y protocolos de actualización en Onco-genética.
3. Establecimiento de las consultas de asesoramiento genético en el cáncer hereditario.
4. Docencia de pre y postgrado
5. Cursos de superación continuada
6. Entrenamiento a especialistas extranjeros.
7. Proyectos de investigación institucionales e interinstitucionales
8. Integración a los staff del Instituto
9. Presentación de resultados científicos en eventos de base, nacionales e internacionales.
10. Publicaciones científicas
11. Tutorías de tesis de grado, Maestrías y doctorados nacionales y extranjeras.
12. Cursos pre congresos en eventos nacionales e internacionales.

CENTROS CUBANOS ESPECIALIZADOS

- Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología
- Servicios provinciales de Oncología
- Instituto Nacional de Hematología e Inmunología
- Centro Nacional de Genética Médica
- Centros provinciales de Genética Médica
- Servicio de Oncohematología del Hospital Pediátrico Juan Manuel Márquez
- Servicio de Oncohematología del Hospital Pediátrico William Soler

Hematología y oncogenética

- Servicio de Hematología del Hospital Pediátrico de Centro Habana
- Servicios de Oncohematología de los Hospitales Pediátricos provinciales de Villa Clara, Camagüey, Holguín y Santiago de Cuba.

CONCLUSIONES

Los avances en el campo de la Oncogenética incrementan la sensibilidad para identificar pacientes con riesgo incrementado para el cáncer e inciden directamente en el asesoramiento genético, perfeccionando las normas del tratamiento y seguimiento del cáncer dentro del sistema de salud. La optimización de las oportunidades de detección de una parte de los casos debidos a síndromes hereditarios es un potencial a utilizar para la disminución significativa de la morbimortalidad por cáncer; la implementación de servicios de este tipo en Cuba demuestra que esto es posible y justifican la necesidad de seguir trabajando en este sentido con carácter interdisciplinar, requerimiento básico del asesoramiento genético en Oncología.

REFERENCIAS

1. Lodish *et al.*, Biología celular y molecular. Buenos Aires: Médica Panamericana. ISBN 950-06-1974-30
2. Cuba. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. Biblioteca Médica Nacional. Cáncer. Mortalidad y Morbilidad. Factográfico de Salud. [Internet]. 2014 Oct [citado 1 de Nov de 2014]; 1(2):[aprox. 14p.]. Disponible en:<http://files.sld.cu/bmn/files/2014/10/factografico-de-salud-octubre-2014.pdf>
3. Garber JE, Offit K. Hereditary Cancer Pre-disposition Syndromes. *J Clin Oncol* 2005; 23:276-92.
4. Nagy, R., Sweet, K. y Eng, C.: «Highly penetrant hereditary cancer syndromes». *Oncogene*, 23, 6445-6470, 2004.
5. WWW.MSAL.GOV.ORG/INC. El ABC del cáncer de mama familiar y hereditario. Instituto Nacional del Cáncer. Plan Nacional de tumores familiares y hereditarios, Argentina, 2013.
6. Documentos www.1aria.com Cáncer familiar y hereditario
7. De la Hoya, M. D. I.: Documento de consenso sobre cáncer de mama hereditario. Documentos de Consenso en Cáncer Hereditario. Madrid: Dispublic, 13-15, 2004. Disponible en: <http://www.seom.org>
8. Vasen, H. F., Mecklin, J. P., Khan, P. M., Lynch, H. T.: «*The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)*». *Dis Colon Rectum*, 34, 424-425, 1991. Disponible en: <http://www.seom.org>
9. Vasen, H. F., Watson, P., Mecklin, J. P., Lynch, H. T.: «New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC». *Gastroenterology*, 116, 1453-1456, 1999. Disponible en: <http://www.seom.org>
10. Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P. *et al.*: «Revised Bethesda Guidelines for hereditary non polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability». *J Natl Cancer Inst*, 96, 261-268, 2004. Disponible en: <http://www.seom.org>

Tópicos selectos de biomedicina

11. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Estadísticas. Anuario Estadístico, 2014.
12. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Nota descriptiva No 297; 2014 [Consultado 2015 febrero]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
13. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) <http://www.seom.org>
14. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Cáncer Hereditario. 2ª ed. Madrid: Instituto Roche; 2010.
15. Guía de Práctica Clínica en cáncer hereditario. Edita: Generalitat. Conselleria de Sanitat Generalitat Valenciana, 2009 Segunda edición.
16. Urioste M. Deteccion e identificacion de sindromes de susceptibilidad al cancer. En Bandres F y Urioste M: «Planteamientos basicos del cancer hereditario: Principales sindromes», Fundacion Tejerina: Madrid, 2011, pp. 27-46
17. Gonzalo Zambrano RD, Fundora Madruga G, Rodríguez Jiménez P, Hernández Fernández D, Rubio MC, Rodríguez Cáceres JM. Impacto de factores pronósticos y predictivos del cáncer de mama en la Unidad Oncológica Provincial, de Matanzas. Rev. Méd Electrón. [Seriada en línea] 2010; 32(5). Disponible en <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202010/vol5%202010/tema08.html> . [consulta: 21-feb-2014]
18. Alonso Sánchez AM, Benavides Orgaz MM, Blanco Guillermo I, Brunet Vidal J, et al. Cáncer hereditario. Madrid: Sociedad Española de Oncología Médica; 2006.
19. Thomas D. Methods for investigating gene-environment interactions in candidate pathway and genome-wide association studies. Annual review of public health. 2010; 31:21.
20. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from <http://globocan.iarc.fr>.
21. Comisión Económica para América Latina y el Caribe. El perfil epidemiológico de América Latina y el Caribe: desafíos, límites y acciones. Santiago de Chile. CEPAL; 2011.
22. Núñez Copo A, Frómata Montoya C, Rubio González T. Factores ambientales y genéticos asociados al cáncer de mama en féminas del área de salud «28 de septiembre». MEDISAN 2011; 15 (2): 162 – 169.
23. Nickels E, *et al.*, Evidence of gene- environment interactions between common breast cancer susceptibility loci and established environmental risk factors. PLOS Genetics 2013; 9 (3): 1-14.
24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5191/def-item/>

Molecular cytogenetics in hematological malignancies

DR. ANNA JAUCH

Institute of Human Genetics, University Hospital Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 366, D-69120 Heidelberg

Since the finding of the Philadelphia chromosome (Ph) in a patient with chronic myeloid leukemia (CML) by Nowell and Hungerford in 1960, the introduction of chromosome banding by Caspersson and Zech in 1970 allowed the identification of specific chromosomes and chromosome regions on the basis of its unique banding pattern. In 1973, Janet Rowley showed the Ph chromosome to be the result of a balanced rearrangement between chromosome 9 and 22 and not as previously thought a deletion of the long arm of chromosome 22. In the late 1970s, molecular genetic methods became available which allowed in the early 1980s the identification of the BCR-ABL fusion gene in the translocation $t(9;22)(q34;q11)$. This specific chromosome aberration provided insight into the biological pathway of the disease and allowed the development of Imatinib - a tyrosine kinase inhibitor-, as the first drug that specifically kills tumor cells in Ph positive CML patients. After this basic discovery, many more chromosome rearrangements were identified in an increasing number of tumor types leading to a deregulation of a gene in one breakpoint or the creation of a hybrid gene through fusion of parts of the two breakpoint genes. The genomic characterization of genes involved in cytogenetically identified rearrangements has led to the identification of more than 700 gene fusions. This number dramatically increased by the introduction of next generation sequencing (NGS), but so far these NGS detected fusion genes have to be validated for their prognostic relevance.

Today, the detection of tumor specific chromosome aberrations using cytogenetic and molecular cytogenetic methods plays an important role for diagnosis, prognosis and risk adapted treatment of patients with hematological malignancies. Furthermore, on the basis of specific chromosome aberrations, leukemias and lymphomas were classified into distinct subgroups and this classification has prognostic implications¹.

In Heidelberg, in our accredited molecular cytogenetic laboratory at the Institute of Human Genetics we offer fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses to patients with leukemia (acute and chronic myeloid and lymphocytic leukemia), lymphoma and multiple myeloma in agreement with the European Leukemia Network Guidelines (<http://www.leukemia-net.org>). The FISH method is a fast and sensitive tool to identify diagnostic and prognostic relevant chromosome aberrations in metaphase spreads and interphase nuclei. The so-called interphase FISH analysis allows the detection of specific chromosome aberrations in direct preparations of bone marrow or peripheral blood cells without the need of cell culture. Using fluorescent labeled gene specific probes, dualcolor dualfusion probes and break apart probes numerical and structural chromosome aberrations can be visualized using a fluorescence microscope.

Hematología y oncogenética

CHRONIC MYELOID LEUKEMIA (CML)

In CML, chromosome banding analysis on cultured bone marrow cells (or peripheral blood cells if the circulating blasts are >10%) is the gold standard for the detection of the Philadelphia chromosome at first diagnosis. Karyotypes with additional abnormalities such as trisomy 8 and 19, der(22) and i(17q) are associated with a shorter overall survival and an increased risk of progression. The interphase FISH analysis with probes for the *BCR-ABL* translocation is mandatory in cases with insufficient numbers of evaluated cells or in patients where no translocation t(9;22)(q34;q11) is detected, which is the case in 5-10% of patients carrying a cryptic *BCR-ABL* rearrangement.

ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML)

According to the WHO classification (2008) AML can be classified into different morphological subgroups with specific chromosome aberrations such as AML-M2 with the translocation t(8;21)^{*ETO-RUNX1*}, acute promyelocytic leukemia (APL) with the translocation t(15;17)^{*PML-RARA*} and AML-M4Eo with inv(16)/t(16;16)^{*MYH11-CBFB*}. All three subgroups are associated with a good prognosis. Poor prognostic chromosome aberrations are a monosomy 5/del(5q), monosomy 7, abnormal 3q (*EVI1/MECOM*), t(6;9), t(9;22), del(17p) or a complex karyotype with >3 aberrations. All other aberrations for example trisomy 8 or 11q23 (*MLL*) rearrangements and a normal karyotype defining the intermediate prognostic category, whereas the normal karyotype patients can be prognostically distinguished by screening for mutations in genes such as *NPM1*, *FLT3*, *CEPBA* and *RUNX1*.

In AML first diagnosis, conventional cytogenetic analysis on cultured bone marrow cells (or peripheral blood cells with circulating blasts >10%) is the gold standard for the detection of prognostic relevant chromosome aberrations. Interphase FISH analysis is strongly recommended to identify cryptic aberrations, such as some *MLL* and *EVI1/MECOM* rearrangements. In the case of a failed or incomplete cytogenetic analysis additional FISH analyses should be performed to screen for high risk aberrations such as monosomy 5/del(5q) and monosomy 7/del(7q). Furthermore, in distinct morphological subtypes interphase FISH analysis can rapidly confirm the diagnosis of an AML-M2, APL or AML-M4eo and allows the subtype specific treatment of the patients. In cases with complex aberrant karyotypes, multiplex-FISH (24-color FISH) with combinatorially labeled painting probes on metaphase spreads of the patient can help to characterize rearranged chromosomes and to clarify the origin of marker chromosomes.

MYELODYSPLASTIC SYNDROME (MDS)

Also in MDS, conventional cytogenetic analysis on cultured bone marrow cells is the preferred method at first diagnosis to identify clonal aberrations. In case of insufficient metaphase spreads (<10) additionally interphase FISH assays including probes for the detection of monosomy 5/del(5q), monosomy 7/del(7q), trisomy 8, del(17p), del(20q) and loss of the Y chromosome should be performed. A MDS 5q- syndrome

Tópicos selectos de biomedicina

or loss of the Y chromosome in male MDS patients are good prognostic markers, trisomy 8 and del(20q) are in the intermediate risk group and monosomy 7/del(7q) as well as del(17p) are high risk aberrations.

CHRONIC EOSINOPHILIC LEUKEMIA

For patients with myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia, interphase FISH analysis is recommended to detect *FIP1L1-RDGFR*A fusions and *PDGFRB* or *FGFR1* rearrangements. If one of these aberrations is present the patient can be treated by low dose Imatinib.

ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (ALL)

In B-lineage ALL, which is the most frequent type in childhood ALL (85%) and adult ALL (75%), a rapid diagnosis is important and therefore FISH probes for the translocations t(9;22)^{*ABL-BCR*}, t(12;21)^{*ETV6-RUNX1*} and MLL rearrangements should be hybridized. Further FISH testing may be considered to detect potential high-hyperdiploidy if the karyotype analysis failed. If Burkitt lymphoma is suspected a MYC break apart probe and if positive dualcolor dualfusion probes for the *MYC-Ig* translocations should be done.

CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL)

In CLL, interphase FISH analysis on direct preparation of peripheral blood cells has emerged as the gold standard for the cytogenetic classification. To assign the patients into clinically relevant prognostic subgroups, FISH with probes for the detection of the recurrent chromosome aberrations deletion 11q22 (*ATM*), 13q14 and 17p13 (*TP53*) as well as trisomy 12q13 (*GLI*) is recommended. Additional FISH analysis using an *IgH* break apart probe is useful to differentiate CLL from mantle cell lymphoma (MCL) or other B-cell lymphomas.

B- AND T-CELL LYMPHOMAS

In lymphomas, molecular cytogenetic analysis is recommended for recurrent chromosome aberrations such as the translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma, the translocation t(14;18)(q32;q21) in follicular lymphoma and MYC rearrangements in Burkitt lymphoma.

MULTIPLE MYELOMA (MM)

In multiple myeloma, interphase-FISH analysis on CD138+ plasma cells is the first line of diagnosis for the detection of deletions 8p21, 13q14 and 17p13, gain of chromosomal regions 5p15/5q35, 9q34, 11q22.3,

Hematología y oncogenética

15q22 and 19q13 as well as recurrent IgH translocations. In Heidelberg, we cooperate with the Hematology Department and the National Center for Tumour Diseases (NCT) in research projects and clinical trials for the risk stratification and the development of innovative new therapies. In our studies we have shown, that deletion 17p13, gain of 1q21 >3 copies as well as the translocation $t(4;14)(p16;q32)^{FRGF3-IgH}$ are associated with a poor prognosis^{2,3}. If IgH break apart probe is positive and no $t(4;14)$ is found additional probes for the translocations $t(11;14)(q13;q32)^{CCND1/MYE6V-IgH}$, $t(14;16)(q32;q23)^{IgH-MAF}$ or $t(6;14)(p21;q32)^{CCND3-IgH}$ are tested. Furthermore, an extended probe panel allows us to identify the hyperdiploid myeloma subgroup by the detection of additional copies of two out of the tested locus specific probes for chromosomes 5, 9, 15 and 19. In the GMMG-HD4 trial we have shown, that high risk patients benefit from a high dose chemotherapy with the proteasome inhibitor Bortezomib⁴.

REFERENCES

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J., Vardiman JW (eds): World Health Organization classification of tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon 2008, IARC Press.
- 2 Neben K, Jauch A, Bertsch U, Heiss C, Hielscher T, Seckinger A, Mors T, Müller NZ, Hillengass J, Raab MS, Ho AD, Hose D, Goldschmidt H: Combining information regarding chromosomal aberrations $t(4;14)$ and $del(17p13)$ with the International Staging System classification allows stratification of myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Haematologica* 2009;95(7).
- 3 Neben K*, Jauch A*, Hielscher T, Hillengass J, Lehnert N, Seckinger A, Granzow M, Raab MS, Ho AD, Goldschmidt H, Hose D (2013). Progression in Smoldering Myeloma Is Independently Determined by the Chromosomal Abnormalities $del(17p)$, $t(4;14)$, Gain 1q, Hyperdiploidy, and Tumor Load. *J Clin Oncol*. 2013 Dec 1;31(34):4325-32. doi: 10.1200/JCO.2012.48.4923. Epub 2013 Oct 21
- 4 Neben K, Lokhorst HM, Jauch A, Bertsch U, Hielscher T, van der Holt B, Salwender H, Blau IW, Weisel K, Pfreundschuh M, Scheid C, Dührsen U, Lindemann W, Schmidt-Wolf IG, Peter N, Teschendorf C, Martin H, Haenel M, Derigs HG, Raab MS, Ho AD, van de Velde H, Hose D, Sonneveld P, Goldschmidt H (2012). Administration of bortezomib before and after autologous stem cell transplantation improves outcome in multiple myeloma patients with deletion 17p. *Blood* 119:940-948.

Evolución clonal en cáncer

JUAN RAMÓN GONZÁLEZ GARCÍA

Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jalisco, México.

La teoría evolucionista del cáncer fue establecida en 1976 por el Dr. Peter Nowell, apoyado en trabajos previos que permitieron visualizar la idea [1,2]. La teoría postuló que la neoplasia inicia en una o unas pocas células, donde ocurre una mutación inicial y —con el tiempo— se forma una subpoblación celular que posee esa particular mutación [1]. Durante la progresión tumoral, la acumulación de mutaciones en esa subclona, u otras derivadas de ésta, ocasiona una heterogeneidad celular dentro del mismo tumor, la cual genera una competencia de supervivencia y dominación entre las diversas subclonas [3-6]. Las presiones selectivas ejercidas por los diversos ecosistemas o microambientes celulares sobre las células neoplásicas disparan remodelaciones genéticas y epigenéticas como respuestas adaptativas, las cuales estarán sujetas a selección natural como principal condicionante para que desaparezcan o permanezcan en la población de células tumorales, generando así nuevas subpoblaciones celulares con diversas capacidades adaptativas [3-7].

Recientemente, se ha postulado que el proceso tumoral pudiera corresponder a un mecanismo natural de especiación [8]. Actualmente se conocen tres ejemplos de cáncer transmisible en la naturaleza que apoyan esta teoría: el tumor facial del demonio de Tasmania, una forma de cáncer similar a leucemia descubierta en las almejas de caparazón blando y el tumor venéreo transmisible de caninos. La característica en común de estos cánceres es que las células tumorales han adquirido la capacidad de transmitirse entre individuos de la misma especie de manera natural, a semejanza de un organismo parásito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194:23-28.
2. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*. 1975;255:197-200.
3. Greaves M. Cancer stem cells: back to Darwin? *Semin Cancer Biol*. 2010;20:65-70. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.03.002. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481:306-313. doi: 10.1038/nature10762.
4. Loeb LA. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:450-457. doi: 10.1038/nrc3063.
5. Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet*. 2012;13:795-806. doi: 10.1038/nrg3317.

Hematología y oncogenética

6. Aktipis CA, Boddy AM, Gatenby RA, Brown JS, Maley CC. Life history trade-offs in cancer evolution. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:883-892. doi: 10.1038/nrc3606.
7. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012;150:12-27. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013.
8. Duesberg P, Mandrioli D, McCormack A, Nicholson JM. Is carcinogenesis a form of speciation? *Cell Cycle*. 2011;10:2100-2114.
9. Murgia C, Pritchard JK, Kim SY, Fassati A, Weiss RA. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*. 2006;126:477-487.
10. Murchison EP, et al. Genome sequencing and analysis of the Tasmanian devil and its transmissible cancer. *Cell*. 2012;148:780-791. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.065.
11. Metzger MJ, Reinisch C, Sherry J, Goff SP. Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in soft-shell clams. *Cell*. 2015;161:255-263. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.042.



Inmunología molecular

TH17 en enfermedades autoinmunes e infecciosas

JOSÉ FRANCISCO ZAMBRANO-ZARAGOZA

Unidad académica de Ciencias Químico-Biológicas y Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit.

Los linfocitos T CD4+ se generan en el timo y tienen un papel importante en la inducción de la respuesta inmunitaria. Después de la estimulación antigénica, los linfocitos T naïve se activan y diferencian en una célula efectora, que puede ser TH1, TH2, TH9, TH17 o TH22. Cada una de estas subclases de linfocitos T se caracteriza por la producción de citocinas, así como por sus funciones efectoras. En particular, la población TH17 se caracteriza por la producción de IL-17 y tienen un papel importante en la inducción y mantenimiento del proceso inflamatorio.

En la generación de linfocitos TH17, participan citocinas como IL-6, TGF β , IL-21 e IL-23. Asimismo, diferentes factores transcripcionales, que incluyen STAT3, ROR γ , NF κ B, I κ B β y Batf. Estas células participan activamente en la defensa contra bacterias extracelulares y hongos. Aunado a esto, se han visto involucradas en diferentes procesos autoinmunes, principalmente en aquellos que cursan con procesos inflamatorios, en el que la principal citocina efectora es IL-17 (1).

Por otra parte, los linfocitos T reguladores (Treg), una subpoblación de linfocitos T CD4+ con actividad supresora, se generan en el timo y participan en el mantenimiento de la tolerancia periférica, aunque el medio pro-inflamatorio localizado puede alterar esta función. Se caracterizan por secretar IL-10 y TGF β y por la expresión de FoxP3. Las células Treg pueden suprimir el proceso inflamatorio mediante mecanismos dependientes (por ejemplo CTLA-4) e independientes de contacto, en este último se incluye la secreción de citocinas anti-inflamatorias (2). Por otra parte, se ha reportado que niveles elevados de IL-6 y TGF β favorecen el desarrollo de TH17, asimismo, concentraciones elevadas de TNF α afectan las funciones de Treg, por lo que contribuye con el desequilibrio entre los procesos pro y anti-inflamatorios (3).

Las células TH17 y las Treg tienen funciones opuestas, lo que se ve reflejado tanto en las enfermedades autoinmunes como inflamatorias, ya que las TH17 promueven la autoinmunidad mientras que las Treg la controlan. Aunado a lo anterior, las rutas para la diferenciación a TH17 o Treg están muy relacionadas, ya que TGF β induce la expresión de FoxP3 y ROR γ , por lo que es crítico para la diferenciación en TH17 y Treg. Sin embargo, TGF β no puede inducir por sí solo la diferenciación a TH17 in vitro, ya que se ha observado que es indispensable la presencia de citocinas pro inflamatorias, como IL-6 o IL-21, para que esto ocurra. De esta manera, la presencia de citocinas pro inflamatorias reduce la expresión de FoxP3, y aumenta la de ROR γ , mediada por TGF β (2). Esto implica que el balance entre estas dos subpoblaciones celulares tiene influencia en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Tomando en cuenta el efecto pro-inflamatorio de las células TH17 se ve contrarrestado por las células Treg, el balance TH17/Treg puede ayudar a comprender el mecanismo inmunológico involucrado en la inducción y regulación del proceso autoinmune y la inflamación crónica (2).

Considerando que las células TH17 promueven la infiltración de neutrófilos y macrófagos al sitio de inflamación, se ha reportado que tanto la frecuencia de células TH17 como los niveles séricos de IL-17 se encuentran alterados en pacientes con enfermedades autoinmunes e inflamatorias como Lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, entre otras (4). En el caso de las enfermedades autoinmunes, no sólo la frecuencia de células TH17 se encuentran alteradas, sino también la relación TH17/Treg, por lo que se ha propuesto que este balance es importante para iniciar o perpetuar el fenómeno autoinmune (3).

STAT4

El gen *STAT4*, está localizado en el cromosoma 2q32.3 y codifica para la proteína STAT-4, que se expresa en monocitos activados de sangre periférica, células dendríticas, macrófagos y linfocitos T en los sitios de inflamación (5). STAT-4 participa en la diferenciación y proliferación de linfocitos TH1 a través de la señalización proporcionada por el receptor de interleucina (IL)-12. Además, STAT-4 regula la secreción de IL-23, citocina involucrada en el desarrollo de células TH17 que juegan un papel crítico en las enfermedades autoinmunes, ya que induce y mantiene el proceso inflamatorio (6, 7). La activación de STAT-4 se realiza por la vía de señalización de las JAK cinasas, que tiene como final la fosforilación, dimerización y translocación de STAT-4 al núcleo (8). Ahí, estimula la transcripción de genes específicos como el de IL-23 (7). IL-23 es un mediador proinflamatorio que junto con IL-6 y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1, activa a STAT-3 a través de la vía de señalización de las JAK cinasas que participa en la diferenciación de las células T CD4+ naïve a células TH17 (7, 9, 10). Además, la secreción de IL-21 funciona como un amplificador autocrino de la respuesta TH17 (figura 2b) (10). Una vez establecidas las células TH17, IL-23 promueve también su estabilización, supervivencia y proliferación (11).

En el gen *STAT4* se ha descrito una variante en el tercer intrón, el SNP rs7574865, que provoca un cambio de una G/T (12), localizada en Chr.2:191964633 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs7574865). El efecto funcional de este SNP no está bien esclarecido, sin embargo, se cree que puede ser responsable de la variación de empalme o efectos reguladores de STAT-4, y se ha asociado con el aumento de la susceptibilidad a la enfermedad (13).

En esta conferencia se abordará los avances en cuanto a la frecuencia de células TH17, la relación TH17/Treg, así como los niveles séricos de IL-17 de IL23 en enfermedades como glioma, tiroiditis de Hashimoto, aterosclerosis, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, pacientes con VIH y VHC (1), así como algunos polimorfismos que tienen implicación en la diferenciación o estabilización de células TH17 en enfermedades autoinmunes, como STAT4.

REFERENCIAS

1. Zambrano-Zaragoza JF, Romo-Martínez EJ, Durán-Avelar MdJ, García-Magallanes N, Vibanco-Pérez N. Th17 Cells in Autoimmune and Infectious Diseases. *Int J Inflamm.* 2014;2014:12.

Tópicos selectos de biomedicina

2. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity reviews*. 2014 Jun;13(6):668-77. PubMed PMID: 24418308.
3. Nagy G, Huszthy PC, Fossum E, Konttinen Y, Nakken B, Szodoray P. Selected Aspects in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:351732. PubMed PMID: 26300591. Pubmed Central PMCID: PMC4537751. Epub 2015/08/25. eng.
4. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DTW, et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2014 12//;13(12):1174-81.
5. Shen L, Liu R, Zhang H, Huang Y, Sun R, Tang P. Replication study of STAT4 rs7574865 G/T polymorphism and risk of rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Gene*. 2013 Sep 10;526(2):259-64. PubMed PMID: 23727609. Epub 2013/06/04. eng.
6. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between the rs7574865 polymorphism of STAT4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology international*. 2010 Mar;30(5):661-6. PubMed PMID: 19588142. Epub 2009/07/10. eng.
7. Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, et al. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007 Apr 15;178(8):4901-7. PubMed PMID: 17404271. Epub 2007/04/04. eng.
8. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby*; McGraw-Hill; 2007.
9. Tang C, Chen S, Qian H, Huang W. Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology*. 2012;135(2):112-24.
10. Deenick EK, Tangye SG. Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol*. 2007 09/04/online;85(7):503-5.
11. Serrano Hernández A. Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*. 2009;05(Extra.1):1-5.
12. Korman B, Kastner D, Gregersen P, Remmers E. STAT4: Genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2008 2008/09/01;8(5):398-403. English.
13. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(10):977-86.

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en autoinmunidad

JOSÉ FRANCISCO MUÑOZ-VALLE Y ULISES DE LA CRUZ-MOSSO

Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara. E-mail: biologiamolecular@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes afectan alrededor del 5-10 % de la población general y son la tercera causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, entre las que se destacan esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso generalizado (LEG) y artritis psoriásica (AP) (Davidson-Diamond, 2001).

Se define como enfermedad autoinmune al síndrome clínico causado por la activación de Linfocitos T y B en ausencia de un proceso infeccioso u otro agente causal discernible. Una falla en los mecanismos normales de autotolerancia da lugar a reacciones frente a tejidos propios que conducen a autoinmunidad y posteriormente al desarrollo de la enfermedad autoinmune (Abbas *et al.* 2008).

La predisposición genética influye en el desarrollo de la autoinmunidad. Las enfermedades autoinmunes son consideradas como patologías complejas, multifactoriales y poligénicas; la susceptibilidad y la severidad con la que se cursen este grupo de patologías no es atribuible a un solo gen, esto es comúnmente el efecto de mecanismos de epistasia entre varios genes (Crispín, *et al.* 2010). Cada alelo contribuye ligeramente a la susceptibilidad de cada enfermedad (OR ~ de 2) y la acumulación del efecto de varios genes es necesaria para aumentar el riesgo en el desarrollo de la enfermedad autoinmune. Las combinaciones de alelos de riesgo que conducen a la predisposición y los mecanismos a través de los cuales contribuyen a la autoinmunidad no han sido del todo dilucidados (Moser, *et al.* 2009; Tsokos, 2011).

Durante los últimos años, el análisis del genoma ha incrementado sustancialmente el número de genes candidato asociados con la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes. De los cuales, se han identificado polimorfismos en genes como *IRF5*, *STAT4*, *TLR8*, *PTPN22* y *PDCD1* que se relacionan con la actividad y función de los linfocitos T y B (Moser, *et al.* 2009; Deng-Tsao, 2010). Además de estos genes, se han identificado polimorfismos en genes que codifican para citocinas con un papel central en la regulación de la inmunidad innata y en la diferenciación de la respuesta inmune adaptativa, como los polimorfismos descritos en el promotor del gen *MIF* que codifica para la citocina factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (Sreih, *et al.* 2011).

De manera consistente en varias poblaciones se ha descrito un incremento significativo de MIF soluble en diversas enfermedades reumáticas inflamatorias que presentan un fuerte componente autoinmune. Por lo que ha sido de interés para nuestro grupo de investigación evaluar la contribución de MIF y de los

polimorfismos descritos en su gen a la fisiopatología de enfermedades autoinmunes como AR, LEG y AP en población mestizo mexicana del Occidente de México.

FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS

MIF fue una de las primeras citocinas descubierta en la década de los 60s y tiene un importante papel en la regulación del sistema inmune y en la respuesta inflamatoria (Calandra-Roger, 2003; Denkinger, *et al.* 2004; Cooke, *et al.* 2009). Se ha establecido que MIF está implicado en la patogénesis de diferentes enfermedades autoinmunes como: glomerulonefritis, esclerosis múltiple, AR y LEG (Sreih, *et al.* 2011; Llamas-Covarrubias, *et al.* 2012).

Estructura y función

MIF es una proteína de 12.5 kDa conformada por 115 aminoácidos con una estructura en homotrímero con subunidades idénticas, cada monómero consiste de 2 cadenas α -hélice antiparalelas y 6 cadenas β . Tres cadenas β están rodeadas por 6 α -hélice antiparalelas y forman una estructura en barril con una terminación abierta. Esta conformación sugiere que MIF participa en interacciones receptor-ligando, dentro de los receptores descritos para MIF destaca CD74 en conjunto con CD44, CD74 es una proteína transmembranal tipo II también conocida como cadena invariante (Ii), implicada en el transporte de proteínas de MHC II del retículo endoplásmico al complejo de Golgi, así también se ha descrito que MIF puede interactuar con los receptores CXCR2 y 4 (Denkinger, *et al.* 2004).

Las células T y macrófagos son las principales fuentes de MIF en el sistema inmune, sin embargo monocitos, células dendríticas sanguíneas, células B, neutrófilos, eosinófilos, células cebadas y basófilos también expresan MIF y en contraste con muchas citocinas, MIF es constitutivamente expresada y almacenada intracelularmente, por lo que no requiere la síntesis de *novo* después de su secreción (Calandra-Roger, 2003). Los niveles de MIF soluble que se han reportado en sujetos clínicamente sanos varían de 2-6 ng/mL (Donn-Ray, 2004).

Esta citocina también se expresa en una amplia variedad de células y tejidos que están en contacto directo con el ambiente natural del hospedero, tales como las células endoteliales del pulmón, células epiteliales, el tracto gastrointestinal y genitourinario; además de varios tejidos del sistema endocrino, especialmente órganos como el hipotálamo y la glándula pituitaria en respuesta al estrés fisiológico y a la presencia de endotoxinas de bacterias Gram (-) y exotoxinas de bacterias Gram (+) (Donn-Ray, 2004; Cooke, *et al.* 2009).

También MIF se ha asociado con la activación de los macrófagos, la inducción de la fagocitosis y el aumento de la inmunidad antitumor. Los macrófagos tienen un papel importante en la secreción de MIF durante la respuesta inmune innata y su secreción en los macrófagos es inducida por lipopolisacárido (LPS), exotoxinas, TNF- α , glucocorticoides e interferón gama (IFN- γ), pero no se ha observado que también sea inducida por IL-1 β o IL-6. De manera diferente en eosinófilos la secreción es promovida por IL-5 y C5a (Denkinger, *et al.* 2004).

Tópicos selectos de biomedicina

Además de ser de las pocas citocinas que se conoce que muestra actividad enzimática, y de ser la primera citocina conocida que no es inhibida por glucocorticoides, puede a su vez contrarregular el efecto anti-inflamatorio e inmunosupresor de estos, controlar la magnitud de la respuesta inflamatoria y promover la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-8 en los macrófagos y de IL-2 e IFN- γ en las células T, lo que lleva posteriormente a la liberación de MIF y a una respuesta de máxima expresión de mediadores proinflamatorios, enzimas que degradan la matriz y ciclooxigenasas. La magnitud de este evento dependerá de la concentración de los glucocorticoides así como de MIF. También hay evidencia que indica que la delección genética o neutralización de MIF tiene un efecto protector en modelos murinos de lupus espontáneo (Aeberli, *et al.* 2006).

De esta manera, se ha demostrado que el incremento en los niveles solubles de MIF puede influir en el desarrollo de enfermedades autoinmunes a través de uno o más de los siguientes mecanismos:

- a) Al contrarrestar los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides
- b) Al estimular la producción de citocinas proinflamatorias
- c) Por incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular, lo que promueve la migración celular
- d) Por incremento de la supervivencia y/o expansión clonal de células inflamatorias (Denkinger, *et al.* 2004).

Descripción del gen

El gen *MIF* se localiza en el cromosoma 22 (22q11.2) y está compuesto de tres exones cortos de 107, 172 y 66 pares de bases (pb) y dos intrones de 188 y 94 pb. En la región reguladora 5' contiene varias secuencias consenso de unión al DNA para factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP1), factor nuclear- κ B (NF- κ B), ETS, GATA, SP1 y proteínas de unión a elementos de respuesta cAMP (CREB), además el gen *MIF* no contiene caja TATA (Calandra-Roger, 2003).

Polimorfismos

Dos polimorfismos funcionales se han reportado en la región del promotor del gen *MIF*, el primero es la repetición corta en tándem (STR, del inglés *Short Tandem Repeat*) -794 CATT₅₋₈ (*rs5844572*) la cual es una repetición en microsatélite de citocina-adenina-timina-timina (CATT) en la posición -794 pb río arriba del gen *MIF*; en el cual, la longitud de las repeticiones (de 5 a 8 repeticiones) se correlacionan con la expresión del gen y con los niveles solubles de MIF en la circulación. En ensayos con genes reporteros se ha demostrado que el alelo CATT₅ *MIF* tiene baja actividad transcripcional mientras que conforme se incrementan las repeticiones de CATT de 6 a 8 veces se observan niveles más elevados de MIF (Donn, *et al.* 2002; Radstake, *et al.* 2005; Renner, *et al.* 2012).

El segundo polimorfismo reportado en la región del promotor del gen *MIF* es el polimorfismo de nucleótido simple (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) -173 G>C (*rs755622*) en la posición

-173 río arriba del gen *MIF* en el cual hay un cambio de guanina (G) por citocina (C), el alelo polimórfico -173*C es asociado con un incremento de los niveles de MIF en la circulación en varias poblaciones, más probablemente estas asociaciones se deban al desequilibrio de ligamiento que existe con el alelo de alta expresión -794 CATT₇ *MIF*. Ambos polimorfismos también se distribuyen diferentes poblaciones con una frecuencia > 5% de los alelos baja expresión (Donn, *et al.* 2004; Zhong, *et al.* 2005).

Estudios de asociación

Los polimorfismos -794 CATT₅₋₈ y -173 G>C en el gen *MIF* se han asociado con el incremento de la susceptibilidad al desarrollo de autoinmunidad y la severidad de las manifestaciones clínicas de enfermedades tales como AR, escleroderma, psoriasis y LEG en diferentes poblaciones (Donn, *et al.* 2004; Radstake, *et al.* 2005; Wu, *et al.* 2006; Sreih, *et al.* 2011).

Un factor clave en dichas asociaciones es la ancestría, la cual puede definir diferencias en la distribución heterogénea de los polimorfismos genéticos y en la susceptibilidad para el desarrollo de diversas enfermedades crónicas de origen autoinmune.

En el Occidente de México se ha estimado la diversidad de la ancestría poblacional, la cual es principalmente Europea (60-64%) seguida por la Amerindia (25-21%) y Africana (15%), lo que en conjunto definen al mestizo Mexicano (Rangel-Villalobos, *et al.* 2008). Por lo que basados en estos antecedentes, ha sido de interés para nuestro grupo de investigación evaluar la contribución de MIF en la fisiopatología de enfermedades como AR, LEG y AP e identificar si los polimorfismos funcionales en el promotor del gen *MIF* son marcadores de susceptibilidad genética para estas enfermedades con un fuerte componente autoinmune.

RESULTADOS

Niveles solubles de MIF en población mestizo mexicana

En pacientes con AR se observó un incremento significativo de los niveles solubles de MIF en etapas tempranas de la enfermedad que tiende a disminuir a través de los años de evolución de la patología. Esto fue posteriormente comprobado mediante modelos de correlación de los niveles solubles de MIF de acuerdo con el tiempo de evolución de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que los niveles solubles de MIF se correlacionan negativamente con los años de evolución de la AR. En las etapas iniciales de la enfermedad se presentan niveles elevados de la citocina, los cuales tienden a disminuir conforma la enfermedad se presenta de forma establecida. Esto podría sugerir que el incremento de MIF está relacionado con el inicio temprano de la AR (Llamas-Covarrubias, *et al.* 2012).

Así también en este mismo estudio, describimos que los niveles solubles de MIF no se correlacionaron con la actividad de la enfermedad pero sí se correlacionan positivamente con TNF- α , lo cual destaca la retroalimentación positiva descrita previamente entre ambas citocinas. En cuanto a los niveles solubles

Tópicos selectos de biomedicina

de TNF- α se correlacionaron con la actividad de la enfermedad pero no se observaron cambios a través del tiempo de evolución, lo cual sugiere que la participación de TNF- α es principalmente en AR activa y establecida (Llamas-Covarrubias, *et al.* 2012; Llamas-Covarrubias, *et al.* 2013).

En un segundo estudio realizado en pacientes con LEG por nuestro grupo de investigación, se determinó que los niveles solubles de MIF (10.74 ng/mL) y de TNF- α (23.01 pg/mL) se encontraron significativamente incrementados y ambas citocinas se correlacionan positivamente ($r = 0.43$; $p < 0.001$) (De la Cruz-Mosso, *et al.* 2014). Lo cual fue consistente con lo ya reportado en nuestro primer estudio en AR y en estudios previos en otras poblaciones (Sreih, *et al.* 2011; Llamas-Covarrubias, *et al.* 2012; Llamas-Covarrubias, *et al.* 2013). Además en este estudio, los pacientes con LEG presentaron niveles en suero de MIF por arriba de los valores normales reportados en sujetos clínicamente sanos (2-6 ng/mL) (Donn-Ray, 2004).

En un tercer estudio de replicación realizado en pacientes con AP se observaron niveles incrementados de MIF (7.8 ng/mL) por arriba de los valores de referencia reportados y de manera similar a los dos estudios previos se observó una correlación positiva entre los niveles solubles de MIF y de TNF- α (Morales-Zambrano *et al.* 2014).

Una posible explicación a estos hallazgos podría ser la bien documentada retroalimentación positiva existente entre MIF y TNF- α soluble reportada en diversos estudios (Donn, *et al.* 2004; Radstake, *et al.* 2005; Wu, *et al.* 2006; Sreih, *et al.* 2011; Llamas-Covarrubias, *et al.* 2013). MIF se ha distinguido funcionalmente de otras citocinas debido a su acción inmunorreguladora en las células del sistema inmune y por la retroalimentación positiva existente con la citocina proinflamatoria TNF- α , el cual es considerado uno de los principales mediadores de daño a células del endotelio vascular y finalmente de órganos en diferentes contextos autoinmunes (Postal-Appenzeller, 2011).

Además en modelos murinos se ha reportado que la inmunoneutralización de MIF disminuye la producción de TNF- α soluble (Leech, *et al.* 1998; Santos, *et al.* 2001; Onodera, *et al.* 2007) y estudios *in vitro* han demostrado que MIF es un potente inductor de TNF- α en macrófagos, lo cual sustenta la retroalimentación positiva descrita entre ambas citocinas (Aeberli, *et al.* 2006; Wijbrandts *et al.* 2009).

Asociación de los polimorfismos 794 CATT₅₋₈ y -173 G>C MIF con la susceptibilidad a AR, LEG y AP en población mestizo mexicana

Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en población mestizo mexicana con AR demuestran la asociación de los alelos de alta expresión -794 CATT₇ y -173*G con el inicio temprano de la enfermedad y con su actividad clínica. En nuestra población los alelos de alta expresión -794 CATT₇ y -173*G MIF presentan un fuerte desequilibrio de ligamiento (LD= 0.87, $p < 0.001$) (Llamas-Covarrubias, *et al.* 2013). Lo cual indica que ambos alelos son segregados en bloque de una generación a otra y podrían conferir un riesgo similar para el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

En nuestro segundo estudio en pacientes con LEG se determinó que aquellos sujetos que son portadores de genotipos que contienen a los alelos de riesgo -794 CATT₇ (OR: 1.86) y -173*G (OR: 1.64) MIF tienen mayor susceptibilidad de presentar LEG en comparación con los sujetos que son portadores de genotipos sin los alelos de riesgo de ambos polimorfismos (De la Cruz-Mosso, *et al.* 2014). En el caso del tercer estudio realizado en pacientes con AP observamos que aquellos sujetos que son portadores del alelo 173*G presentan 7.2 veces mayor riesgo de presentar AP, lo cual es un OR alto atribuido a un polimorfismo de baja penetrancia (OR: 7.2) (Morales-Zambrano *et al.* 2014).

CONCLUSIONES

Los genotipos portadores de los alelos de alta expresión -794 CATT₇ y -173*C *MIF* se asocian con el incremento de la susceptibilidad a enfermedades con un fuerte componente autoinmune en población mestiza del occidente de México.

Los hallazgos obtenidos en nuestra población proveen la evidencia de que los polimorfismos funcionales en el promotor del gen *MIF* están asociados con la susceptibilidad a AR, LEG y AP así como al incremento de los niveles solubles de MIF, lo cual podría contribuir a la persistencia de la enfermedad al inducir a la desregulación de otras citocinas proinflamatorias en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes.

REFERENCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2008. Tolerancia. En: Elsevier editores. Inmunología celular y molecular. 6ta ed. Elsevier. Barcelona (España): 243-263.
2. Calandra T, Roger T, 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3(10):791-800.
3. Cooke G, Armstrong M, 2009. Macrophage migration inhibitory factor (MIF), enzymatic activity and the inflammatory response. *BioFactors (Oxford, England)*, 35(2): 165-168.
4. Crispín, J. *et al.*, 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends. Mol. Med.* 16(2):47-57.
5. Davidson A, Diamond B, 2001. Autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.* 345(5):340-350.
6. De la Cruz-Mosso U *et al.*, 2014. Macrophage migration inhibitory factor: Association of -794 CATT₅₋₈ and -173 G>C polymorphisms with TNF- α in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*, 75(5):433-439.
7. Deng Y, Tsao B, 2010. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6(12):683-692.
8. Denkinger C *et al.*, 2004. Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 52(6):389-400.
9. Donn, R. *et al.*, 2002. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 46(9): 2402-2409.
10. Donn R, Ray D. 2004. Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule. *J. Endocrinol.* 182(1):1-9.
11. Llamas-Covarrubias M *et al.*, 2012. Serum levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with rheumatoid arthritis course. *Rheumatol. Int.* 32(8):2307-2311.
12. Llamas-Covarrubias, M.A. *et al.*, 2013. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Genetic evidence for participation in early onset and early stage rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 61(3): 759-765.

Tópicos selectos de biomedicina

13. Morales-Zambrano R *et al.*, 2014. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promoter polymorphisms (-794 CATT₅₋₈ and -173 G>C): association with MIF and TNF α in psoriatic arthritis. *Int J Clin Exp Med.* 15;7(9):2605-14.
14. Moser K *et al.*, 2009. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 10(5):373-379.
15. Postal M, Appenzeller S., 2011. The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cytokine*, 56(3):537-543.
16. Rangel-Villalobos H *et al.*, 2008. Genetic admixture, relatedness, and structure patterns among Mexican populations revealed by the Y-chromosome. *Am. J. Phys. Anthropol.* 135(4):448-461.
17. Renner P. *et al.*, 2012. A functional microsatellite of the macrophage migration inhibitory factor gene associated with meningococcal disease. *FASEB journal*, 26(2):907-916.
18. Sreih A. *et al.*, 2011. Dual effect of the macrophage migration inhibitory factor gene on the development and severity of human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 63(12):3942-3951.
19. Tsokos, G 2011. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 365(22):2110-2121.
20. Wu S *et al.*, 2006. Macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphisms and the clinical expression of scleroderma. *Arthritis Rheum.* 54(11):3661-3669.

Dolor artrítico: causas, mecanismos y oportunidades terapéuticas

MARTHA RAMÍREZ ROSAS, ENRIQUETA MUNOZ ISLAS Y JUAN MIGUEL JIMÉNEZ ANDRADE

Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán, Reynosa, Tamaulipas

1. ANTECEDENTES

La artritis reumatoide (AR), es una enfermedad poliarticular, crónica, progresiva, inflamatoria, autoinmune y asociada con efectos articulares, extraarticulares y sistémicos(1). La AR afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. El principal síntoma es el dolor crónico, que repercute en la calidad de vida de las personas generando altos costos socioeconómicos (2, 3).

En México, se ha reportado que la prevalencia de enfermedades reumáticas afectan al 10 % de la población, siendo la AR una de las causas principales por lo que los pacientes asisten a consultas (4). La AR generalmente se presenta en los años más productivos de la edad adulta, entre los 20 y 40 años y es una condición incapacitante que frecuentemente causa dolor y deformidad en las articulaciones (5), siendo las mujeres más propensas a desarrollar esta patología en una proporción 3:1 con respecto a los hombres (6).

2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

La característica principal de la AR es la inflamación del tejido sinovial (sinovitis), que conduce a la destrucción del cartílago y del hueso adyacente (2). Durante el proceso inflamatorio crónico se presenta una migración de macrófagos, monocitos, fibroblastos, linfocitos T y B, células plasmáticas, neutrófilos, mastocitos y células dendríticas hacia la membrana sinovial (infiltración celular), acompañado de un aumento del líquido sinovial. Además, se produce una proliferación de la membrana sinovial (hiperplasia) y una angiogénesis pronunciada, formando un tejido local invasivo denominado pannus, que es característico de la AR (1) (Figura 1).

Inmunología molecular

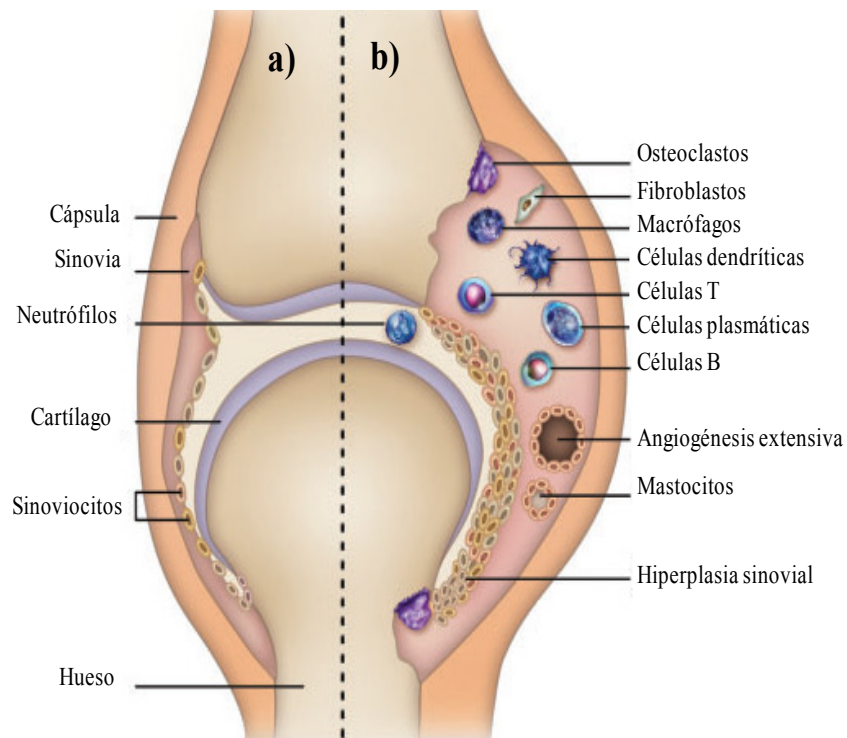


Figura 1. Esquema de una articulación normal (a) y una articulación afectada por la artritis reumatoide (b). En la AR la membrana sinovial sufre una hiperplasia, infiltración de células inflamatorias y osteoclastos. Con la progresión de la enfermedad, dentro de la membrana sinovial se forma un tejido patológico denominado pannus, que migra sobre y dentro del cartílago articular y el hueso adyacente. Modificado de Choy 2012(1).

En la fisiopatología de la AR intervienen varias cascadas de señalización, que convergen en una vía final común en la que persiste la inflamación sinovial asociada a daños al cartílago y al hueso periarticular. Una de éstas cascadas está relacionada con la sobreproducción y sobreexpresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) conduciendo tanto a una inflamación del tejido sinovial (7), como a la destrucción del cartílago de las articulaciones (8). La sobreproducción de TNF- α se debe a varias causas, incluyendo interacciones entre los linfocitos T y B, fibroblastos y macrófagos(9, 10). Otra citosina importante en la patología de la AR es la interleucina 1beta (IL-1 β) que se expresa principalmente en monocitos, células B, fibroblastos sinoviales y condrocitos (1). Por lo tanto, las citosinas TNF- α e IL-1 β , son liberadas principalmente por macrófagos y linfocitos, y son responsables de inducir la síntesis de quimiocinas como IL-8 y moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión inter-celular-1 (ICAM-1) (11). También estas citosinas aumentan la liberación de ROS (especies reactivas de oxígeno), induciendo la expresión de enzimas pro-inflamatorias como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) e incrementan la producción de enzimas digestivas como las metaloproteinasas de matriz (MMP), que degradan la matriz extracelular del cartílago. El papel de estas dos citosinas en la patogénesis de la enfermedad es primordial y contribuyen a la cronicidad de la misma.

Otras citosinas involucradas en éste proceso son la IL-17, la cual se sobreexpresa en fibroblastos sinoviales y se libera por células Th17, cuya proliferación está dada por la liberación de IL-23. La IL-17 también promueve la liberación de MMP, osteoclastogénesis, hematopoyesis y producción de citosinas por parte

Tópicos selectos de biomedicina

de leucocitos (12). La IL-6 es otra citosina representativa de la enfermedad, la cual es expresada por monocitos, fibroblastos sinoviales, células T y B, promoviendo la proliferación de células B para la producción de anticuerpos e induciendo la producción de enzimas degradadoras de matriz como las MMP, agreganasas, catepsinas (13). La presencia de un amplio espectro de células inflamatorias da lugar a una respuesta inmune continua en la articulación reumática.

3. TRANSMISIÓN DEL DOLOR ARTRÍTICO

El dolor articular es el síntoma más frecuente en pacientes con artritis reumatoide, el cual disminuye significativamente el estado funcional y la calidad de vida, debido a que produce disminución de la movilidad, originando discapacidad física (14). El dolor articular ocurre con el movimiento y/o el uso de la articulación afectada (dolor evocado); sin embargo, también se presenta frecuentemente cuando el paciente está en reposo (dolor espontáneo) (15, 16). Se ha sugerido que ambos tipos de dolor en el paciente artrítico, se deben a que la artritis produce una inflamación severa, daño tisular, erosión ósea y una reorganización anormal de las fibras nerviosas en la articulación afectada (17).

Los fenómenos de transducción y transmisión se realizan a través de diferentes fibras, las cuales se clasifican de acuerdo a su diámetro, grado de mielinización y velocidad de conducción (18):

1. Fibras A β : Gruesas (más de 10 μm de diámetro) mielinizadas y de conducción rápida (30-100 m/seg).
2. Fibras A δ medianas (2-6 μm de diámetro), mielinizadas y de conducción intermedia (12-30 m/seg).
3. Fibras C: delgadas (0.4 – 1.2 μm de diámetro) desmielinizadas y de conducción lenta (0.5-2 m/seg).
Éstas fibras pueden clasificarse bajo el punto de vista neuroquímico en:
 - a) Peptidérgicas o sensibles a capsaicina. Sintetizan sustancia P y el péptido relacionado con el CGRP. Son sensibles al factor de crecimiento nervioso. Causantes de la inflamación neurogénica.
 - b) No peptidérgicas: presentan el protoncogen tirosin cinasa (TRK), RET, un receptor para el factor de crecimiento nervioso derivado de la glía y el receptor purinérgico P2X₃.

Estas fibras ó nociceptores desempeñan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

4. TRATAMIENTO DE LA AR

El tratamiento de la AR es un importante problema de salud pública, debido a que cada grupo de fármacos empleado, presenta importantes efectos adversos derivado del tiempo por el cual se emplea el tratamiento de la AR, ya que es un proceso continuo y las evaluaciones recurrentes de los pacientes bajo dicho tratamiento son fundamentales. Los pacientes deben ser evaluados cada 2 o 3 meses para controlar la progresión de la enfermedad, las manifestaciones extra-articulares, así como su capacidad funcional y de manera imperativa, los efectos adversos de la medicación (19, 20). La tabla 1 describe los principales

grupos de medicamentos utilizados en el tratamiento de la artritis reumatoide y sus principales efectos adversos.

TABLA 1. Tratamiento farmacológico en la AR

Fármacos	Efectos adversos en tratamientos crónicos
AINE's	Gastrointestinales (sangrado por úlceras), hepáticos y renales.
Glucocorticoides	Osteoporosis y riesgo de fracturas, inmunosupresión, aumento de peso, cataratas e hiperglucemia.
FARME	Daño pulmonar y hepático.
Agentes biológicos	Reacción en el sitio de inyección, neutropenia, aumento del riesgo de infecciones.

AINE's: Anti-inflamatorios no esteroideos

FARME: Fármacos antireumáticos modificadores la enfermedad

5. MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS A NIVEL PERIFÉRICO INVOLUCRADOS EN LA TRANSMISIÓN Y MANTENIMIENTO DEL DOLOR ARTRÍTICO

La AR es una enfermedad multifactorial y como tal, los mecanismos responsables de mantener y propiciar el dolor en la articulación artrítica pueden ser diversos.

5.1 Componente inflamatorio en la fisiopatología del dolor en AR

En la AR existe una activación patológica del sistema inmune y como una de las enfermedades autoinmunes más importantes a nivel mundial. ésta enfermedad tiene un fuerte componente inflamatorio mediado principalmente por las células del sistema inmune las cuales liberan sustancias que son capaces de activar los nociceptores que inervan la articulación. La inflamación en las articulaciones ocasiona sensibilización periférica (incremento de la sensibilidad de los nociceptores) y sensibilización central (hiperexcitabilidad de las neuronas nociceptivas de la médula espinal y centros cerebrales superiores) (21). Durante la inflamación en la articulación, las neuronas aferentes primarias se encuentran desensibilizadas, lo cual ocasiona que bajo estas condiciones de inflamación, el sistema nociceptivo se active por estímulos mecánicos normales y no dolorosos, conocidos como hiperalgesia. La sensibilización periférica comúnmente es el resultado de la inflamación asociada a cambios en el entorno químico de las fibras nerviosas (22). Las

Tópicos selectos de biomedicina

células dentro del sinovio como las células endoteliales, mastocitos, basófilos, macrófagos, neutrófilos y fibroblastos producen y liberan diversos agentes neuroactivos que incluyen iones (K^+ e H^+), aminas (5-hidroxitriptamina), histamina, prostanoideos (prostaglandina E_2), purinas (ATP), y citosinas (IL- 1β , IL-6, TNF- α). Los nociceptores expresan uno o más receptores de superficie capaces de reconocer y responder a cada uno de estos agentes pro-inflamatorios (23). Tales interacciones, facilitan la excitabilidad de las fibras nerviosas aumentando así su sensibilidad llevando a los pacientes a percibir sensaciones dolorosas. Sin embargo estos mecanismos de dolor no están confinados a la periferia. Un incremento en la sensibilidad a las fibras nerviosas que transmiten estas señales eléctricas al sistema nervioso central es lo que podría explicar el mantenimiento del dolor artrítico (21, 24-26). Debido a que actualmente la etiología de la AR no se conoce en su totalidad, no existe un tratamiento específico para aliviar la enfermedad, por ello el objetivo del tratamiento farmacológico se enfoca en disminuir la actividad antiinflamatoria para la obtención de un alivio sintomático significativo del dolor. Sin embargo, los analgésicos son altamente asociados con serios efectos adversos, que derivan principalmente del largo tiempo del tratamiento y la administración sistémica (3, 4, 6). Además, evidencias nos indican que existen otros componentes involucrados en la fisiopatología de la enfermedad, aunados al componente inflamatorio, esto debido a que se ha observado que los antiinflamatorios no esteroideos y/o corticosteroides a pesar de quitar la inflamación, no quitan el dolor. De manera importante se ha observado que pacientes con AR no presentan inflamación pero tienen dolor. En éste sentido, estudios experimentales han demostrado que la acidosis medida por los osteoclastos y la resorción ósea están involucradas de manera importante en la generación y mantenimiento del dolor artrítico (27).

5.2 Componente osteoclástico en la fisiopatología del dolor en la AR

Las células efectoras de la erosión ósea son los osteoclastos (OC), que son células multinucleadas pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear formadas por la fusión de precursores mieloides (28). En condiciones normales los osteoclastos se encuentran en la superficie de la trabécula y del hueso cortical, donde crean las lagunas de resorción, las cuales son repobladas por osteoblastos llenando esos sitios con hueso nuevo, encontrándose éstos dos procesos en equilibrio dinámico. Sin embargo, existen patologías en las que se pierde éste balance y se tiene una pérdida de hueso como la metástasis debida a tumores, la osteoporosis, y la AR (29). Una característica típica del tejido inflamado de la membrana sinovial es que contiene monocitos que se convierten en osteoclastos con el contacto de las señales apropiadas (30). Los sinoviocitos tipo fibroblastos o las células T activadas, son uno de los tipos celulares más importantes que proveen de las señales necesarias para diferenciar a los monocitos en osteoclastos. Los sinoviocitos tipo fibroblasto son parte del pannus que invade el cartílago y el hueso y se encuentran localizados cerca de los sitios de erosión (31). La vía RANKL-RANK-OPG tiene una participación muy importante en el metabolismo óseo, permitiendo la interacción de los osteoblastos y los osteoclastos con la superficie del hueso para balancear la formación y resorción ósea (32). Los osteoclastos expresan enzimas que degradan hueso como la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), catepsina K y MMP 9(30). Por lo que reportes de estudios tanto en animales como en humanos han sugerido que los osteoclastos, además de desempeñar un papel fundamental en la pérdida de hueso inducida por la AR, también contribuyen a la etiología del

Inmunología molecular

dolor artrítico(33, 34). La actividad de reabsorción ósea de los osteoclastos se ve amplificada debido a la expresión del canal cloro y a la liberación de iones H^+ , los cuales acidifican el espacio extracelular permitiendo la función correcta de las enzimas degradadoras de hueso (35). El osteoclasto, también cuenta con una morfología especial para realizar su trabajo, presentando un borde rugoso que facilita la secreción directa de enzimas en un espacio celular definido y sellado mediante integrinas alfa y beta 3 (12).

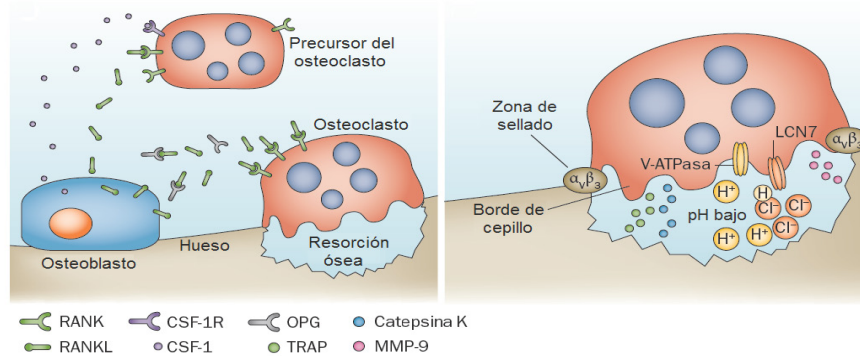


Figura 2. Diferenciación y activación de los osteoclastos. (A) Moléculas implicadas en la diferenciación de los osteoclastos. (B) componentes del osteoclasto implicados en el proceso de resorción ósea. Los canales de ATP y LCN7 presentes en los osteoclastos reducen el pH del microambiente permitiendo que las enzimas como la catepsina K participen en la resorción de matriz ósea. Adaptado de Adamopoulos et al 2014.(10)

El CSF-1, es una citocina que se sintetiza y libera principalmente de células osteoblásticas y estromales, donde se une a su respectivo receptor (CSF-1R) y promueve la expresión del receptor activador del factor nuclear- κB (RANK), que al ser estimulado por su ligando (RANKL) evoca la fusión de macrófagos formando el osteoclasto maduro y produciéndose la reabsorción ósea (ver Figura 2) (28). Diversos estudios han demostrado un aumento en la activación de estas vías de señalización en patologías donde existe una excesiva reabsorción ósea como la osteoporosis, artritis reumatoide y el cáncer metastásico en hueso (21, 36-40). Por lo que el CSF-1 y RANKL son las citocinas críticas que regulan de manera directa la diferenciación de precursores osteoclásticos a osteoclastos multinucleados maduros y la reabsorción ósea. Actualmente, se cree que el dolor espontáneo y el dolor evocado por el movimiento son impulsados principalmente por una inflamación crónica de las articulaciones que induce tanto sensibilización periférica como central(41). Recientemente a través de estudios preclínicos se ha demostrado que los osteoclastos juegan un papel importante en la pérdida de hueso inducida por la artritis y contribuyen a una mayor incidencia de fracturas en este tipo de pacientes. En éste sentido, los bisfosfonatos son potentes inhibidores de la resorción ósea mediada por los osteoclastos. Estos han sido ampliamente usados en el tratamiento de la osteoporosis y otras enfermedades en las que hay una alta remodelación ósea (42). Es importante mencionar que durante el desarrollo y establecimiento de la condición artrítica, se presenta una liberación masiva de citosinas pro-inflamatorias que conllevan a una actividad anormal de los osteoclastos a través de la producción de enzimas proteolíticas y protones que degradan la matriz ósea y los componentes inorgánicos modificando el pH de la zona (4.0-5.0). Estos protones a continuación activan diferentes canales como el receptor vanilloide de potencial transitorio tipo 1 (TRPV1) y canales iónicos de

detección de ácidos (ASICs) que son expresados en las neuronas aferentes primarias (nociceptores) que inervan la articulación causando dolor artrítico(43, 44) . En éste sentido, estudios previos han reportado que diferentes bifosfonatos incluyendo el zoledronato, alendronato, risedronato, minidronato, clodronato y el pamidronato tienen efectos antihiperálgicos en modelos de dolor agudo(34, 45, 46). Por lo que se propone que los bifosfonatos podrían ser fármacos empleados en la AR a través de ejercer un efecto inhibitorio sobre la resorción ósea y previniendo finalmente el dolor artrítico.

Además del dolor causado por la resorción ósea mediada por los osteoclastos y por la inflamación que afecta las articulaciones, estudios recientes han demostrado que las fibras nociceptivas juegan un papel importante en la transmisión del dolor. Se cree que el dolor espontáneo y el dolor evocado son en gran medida debidos al daño en la articulación y/o la inflamación que conllevan a una sensibilización periférica (incremento en la sensibilidad de los nociceptores de las neuronas primarias aferentes) y a una sensibilización central (hiperexcitabilidad de las neuronas que transmiten el dolor a nivel del SNC) (47).

5.3 Componente neurogénico en la fisiopatología del dolor en la AR

Un mecanismo potencial que podría explicar la disociación entre la progresión de la enfermedad y el dolor artrítico, es la existencia de un arreglo patológico de fibras sensoriales (sprouting y formación de microneuromas Figura 3) reportado recientemente(48).

Se ha demostrado que las fibras que inervan la articulación no son simples estructuras estáticas que responden a cambios en la articulación y en el hueso, sino que más bien pueden experimentar una importante reorganización alterando la morfología, incrementado la densidad de fibras nerviosas por unidad de área y sprouting (dispersándose) a áreas dentro de la articulación que normalmente son poco inervadas, asimismo, surgen la formación de neuromas en el sinovio y el periostio femoral, los cuales están relacionados con la presencia de dolor severo y crónico ya que suelen presentar descargas ectópicas espontáneas, en parte por una regulación a la alta de canales de sodio, pudiendo explicar parcialmente el dolor espontáneo en la AR (dolor en estado de reposo).

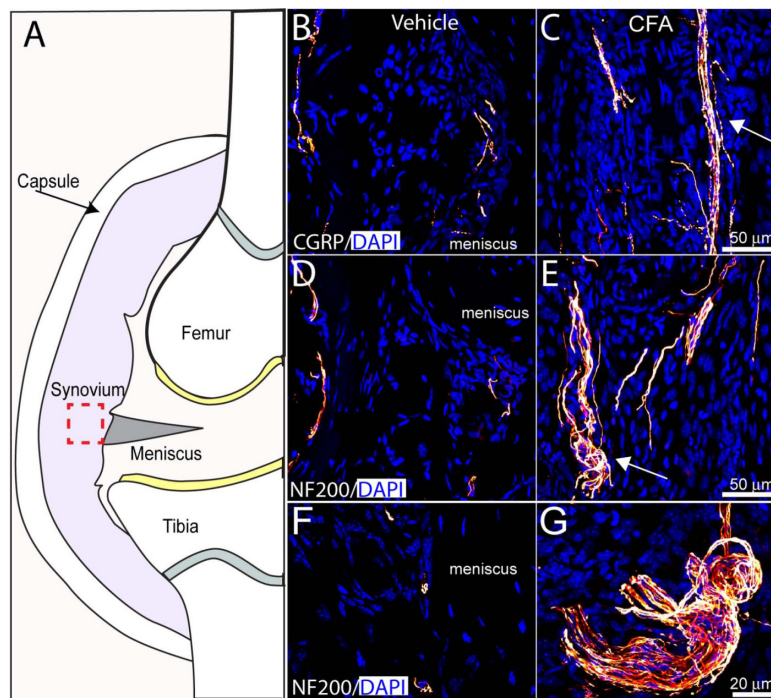


Figura 3. Sprouting de fibras nerviosas y formación de neuromas en la articulación artrítica de ratones geriátricos. (A) Región del sinovio; (B,D,F) imágenes representativas con focal de CGRP, NF200 y marcador nuclear DAPI en secciones de rodilla (20 μm de grosor); (C,E,G) inyectados con CFA.

En estos efectos se ha observado que el factor de crecimiento nervioso (NGF) desempeña un papel fundamental, ya que las fibras aferentes peptidérgicas primarias y las simpáticas en la etapa temprana postnatal de desarrollo son dependientes del NGF y en la etapa adulta es requerido para la supervivencia de las neuronas y mantenimiento de las propiedades fenotípicas en las aferencias peptidérgicas. (49). El NGF desarrolla un papel importante en mediar la respuesta inflamatoria después del daño tisular (50).

En el dolor artrítico la sensibilización periférica y central desempeñan un papel primordial a nivel de la articulación, debido a que la articulación y el hueso adyacente son dañados por la inflamación y los nervios que inervan el hueso son activados principalmente y sensibilizados por factores como bradicinina, prostaglandina E₃, prostaciclina I₂, serotonina, SP, galanina y neuropeptido Y.

Asimismo, Da Silva y cols (51), reportaron que en un modelo de mono artritis unilateral hay presencia de sprouting de fibras simpáticas en el sinovio del tobillo como en la piel adyacente y que el NGF parece estar involucrado tanto en el sprouting simpático y en el dolor derivado de las conductas. Las neuronas simpáticas dependen del NGF para sobrevivir (49) y expresan una alta afinidad al TrKA(50). Los niveles del NGF están incrementados en el fluido sinovial de pacientes con AR.

Estas evidencias en su conjunto nos indican que las fibras nerviosas no son estructuras estáticas, sino que son estructuras dinámicas que pueden modificar tanto su expresión, ubicación, neuroquímica y morfología participando de manera dinámica en los cambios y efectos presentes en la progresión de la enfermedad y el dolor articular.

Tópicos selectos de biomedicina

6. OPORTUNIDADES TERAPÉUTICAS Y CONCLUSIONES

A pesar de los diversos modelos animales que están disponibles y permiten estudiar la fisiopatología del dolor artrítico, existen relativamente pocas nuevas terapias para aliviar este dolor. Sin embargo, los nuevos mecanismos propuestos de la transmisión del dolor artrítico pueden permitir el diseño de ensayos clínicos para evaluar la eficacia de estas nuevas terapias para tratar el dolor artrítico (terapias que bloqueen la vía NGF/TrkA o CSF-1/CSF-1R, bifosfonatos). Si estas terapias muestran eficacia y un perfil de seguridad adecuado para tratar el dolor crónico en pacientes con AR, estas tienen el potencial de mejorar el estado funcional, la calidad de vida y la sobrevivencia de los millones de pacientes afectados por dolor artrítico.

7. REFERENCIAS

1. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2012;51 Suppl 5:v3-11.
2. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001;358(9285):903-11.
3. Pitzalis C, Kelly S, Humby F. New learnings on the pathophysiology of RA from synovial biopsies. *Current opinion in rheumatology*. 2013;25(3):334-44.
4. Ventura-Rios L, Banuelos-Ramirez D, Hernandez-Quiroz Mdel C, Robles-San Roman M, Irazoque-Palazuelos F, Goycochea-Robles MV. Patient survival and safety with biologic therapy. Results of the Mexican National Registry Biobadamex 1.0. *Reumatologia clinica*. 2012;8(4):189-94.
5. WH O. Chronic rheumatic conditions 2015.
6. J.R. OD. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *The new england journal of medicine*. 2004;350(25):2591-602.
7. Wong PK, Quinn JM, Sims NA, van Nieuwenhuijze A, Campbell IK, Wicks IP. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):158-68.
8. Feldmann M, Brennan, F.M., Maini, R.N. Rheumatoid arthritis. *Cell*. 1996;85(3):307-10.
9. Wong. PK, Quinn, J.M., Sims, N.A., Van Nieuwenhuijze, A., Campbell, I.K., Wicks, I.P. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(1):158-68.
10. Adamopoulos IE, Mellins, E.D. Alternative pathways of osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2015;11(3):189-94.
11. Shiozawa S, Tsumiyama K, Yoshida K, Hashiramoto A. Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011;59(2):89-95.
12. Teitelbaum. SL, Ross., F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews genetics*. 2003;4(6):638-49.
13. Walsh. MC, Choi., Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Frontiers in immunology*. 2014;5:511.

14. Sprangers MA, de Regt E.B., Andries, F., Van Agt H.M., Bijl, R.V., de Boer J.B. et al. Which chronic conditions are associated with better or poorer quality of life? *J Clin Epidemiol.* 2000;16(106-12).
15. Papageorgiou ACaB, E.M. The quality of pain in arthritis: the words patients use to describe overall pain and pain in individual joints at rest and on movement. *J Rheumatol.* 1989;16(1):106-12.
16. Wagstaff S. SOVyWPH. Verbal pain descriptors used by patients with arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1985;44:262-5.
17. Ghilardi JR, Freeman KT, Jimenez-Andrade JM, Coughlin KA, Kaczmarska MJ, Castaneda-Corral G, et al. Neuroplasticity of sensory and sympathetic nerve fibers in a mouse model of a painful arthritic joint. *Arthritis Rheum.* 2012;64(7):2223-32.
18. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* 2009;139(2):267-84.
19. Rheumatology ACo. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2002. p. 328-46.
20. Cimmino MA SC, Macchioni P, Montecucco C, Fossaluzza V, Mascia MT, et al. Extra-articular manifestations in 587 Italian patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international.* 2000;196:213-7.
21. Toh ML, Bonnefoy JY, Accart N, Cochin S, Pohle S, Haegel H, et al. A CSF-1 receptor monoclonal antibody has potent bone and cartilage protective effects in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014.
22. Campbell IK RM, Bischof RJ, Hamilton JA. The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J Leukoc Biol.* 2000;681(144-150).
23. Yang YH HJ. Dependence of interleukin-1-induced arthritis on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Arthritis and rheumatism* 2001;441:111-9.
24. Paniagua RT CA, Mariano MM, Stein EA, Wang Q, Lindstrom TM, et al. 2001;Fms-mediated differentiation and priming of monocyte lineage cells play a central role in autoimmune arthritis(121):R32.
25. Ohno H UY, Murooka H, Takanashi H, Tokieda T, Ohzeki Y, et al. The orally-active and selective c-Fms tyrosine kinase inhibitor Ki20227 inhibits disease progression in a collagen-induced arthritis mouse model. *Eur J Immunol.* 2008;381:283-91.
26. Conway JG PH, Bergquist ML, Han B, Depee S, Tadepalli S, et al. Effects of the cFMS kinase inhibitor 5-(3-methoxy-4-((4-methoxybenzyl)oxy)benzyl)pyrimidine-2,4-diamine (GW2580) in normal and arthritic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008(3261):41-50.
27. Helmick CG FD, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, et al. . Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis and rheumatism.* 2008;581:15-25.
28. Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong le T. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *European journal of clinical investigation.* 2012;42(12):1332-41.
29. H. T. New developments in osteoimmunology. *Nature reviews Rheumatology* 2012;811:684-9.
30. Wong BR JR, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *The Journal of experimental medicine.* 1997;18612:2075-80.

Tópicos selectos de biomedicina

31. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423(6937):356-61.
32. Lacey DL TE, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;932:165-76.
33. Bromley M, Woolley, D.E. Chondroclasts and osteoclast at subchondral sites of erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum*. 1984(27):968-75.
34. Nagae M, Hiraga, T., Wakabayashi, H., Wang, I., Iwata, K., Yoneda, T. Osteoclasts play a part in pain to the inflammation adjacent to bone. *Bone*. 2006(39):1107-15.
35. Kartsogiannis V ZH, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone*. 1999.
36. Geusens P. The role of RANK ligand/osteoprotegerin in rheumatoid arthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2012;4(4):225-33.
37. Tsourdi E, Rachner TD, Rauner M, Hamann C, Hofbauer LC. Denosumab for bone diseases: translating bone biology into targeted therapy. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2011;165(6):833-40.
38. Santini D, Fratto ME, Vincenzi B, Napoli N, Galluzzo S, Tantardini M, et al. Denosumab: the era of targeted therapies in bone metastatic diseases. *Current cancer drug targets*. 2009;9(7):834-42.
39. Hiraga T, Nakamura H. Imatinib mesylate suppresses bone metastases of breast cancer by inhibiting osteoclasts through the blockade of c-Fms signals. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;124(1):215-22.
40. Cenci S, Weitzmann MN, Gentile MA, Aisa MC, Pacifici R. M-CSF neutralization and egr-1 deficiency prevent ovariectomy-induced bone loss. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(9):1279-87.
41. Schaible H.G. EAYVBGS. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;966:343-54.
42. Drake M.T. CBL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(1032-45).
43. Izumi M, Ikeuchi, M. Ji, Q., Tani, T. Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis. *J Biomed Sci*. 2012;19:77-84.
44. Keeble J, Russel, F., Curtis, B., Starr, A., Pinter, E., Brain, S.D. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in the vascular and hyperalgesic components of joint inflammation. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3248-56.
45. Bonabello A, Galmozzi, M.R., Bruzzese, T., Zara, G.P. Analgesic effect of bisphosphonates in mice. *Pain*. 2001;91:269-75.
46. Carvalho AP, Bezerra, M.M., Girao, V.C., Cunha, F.Q., Rocha, F.A. Antiinflammatory and anti-nociceptive activity of risedronate in experimental pain models in rats and mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33:601-6.
47. Schaible H.G. R, F., Ebersberger, A., Boettger, M.K., Vanegas, H., Natura, G., et al. Joint pain. *Exp Brain Res*. 2009;196:153-62.
48. Jimenez-Andrade JM, Mantyh PW. Sensory and sympathetic nerve fibers undergo sprouting and neuroma formation in the painful arthritic joint of geriatric mice. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(3):R101.
49. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 1987;237:1154-62.

50. McMahon SB, Bennett, D.L., Bevan, S. eds. Inflammatory mediators and modulators of pain. London:Elsevier Churchill Livingstone. 2006.
51. Longo G, Osikowicz, M., Da Silva, A.R. Sympathetic fiber sprouting in inflamed joints and adjacent skin contributes to pain-related behaviour in arthritis. *The journal of neuroscience*. 2013;33(24):10066-74.



Infectología molecular

Tópicos selectos de biomedicina

Ómica de parásitos helmintos

JUAN PEDRO LACLETTE, JULIO CÉSAR CARRERO Y RAÚL J. BOBES

Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. México D.F. 04510. México. laclette@biomedicas.unam.mx

Los parásitos son organismos que han convivido con sus hospederos desde hace millones de años y pueden ocasionar graves enfermedades, produciendo, dependiendo del parásito en cuestión, un alto porcentaje de morbilidad y mortalidad ya sea en humanos o animales. En particular los helmintos, son parásitos que causan enfermedades de importancia en salud pública, afectando al humano, la producción animal y agrícola, conociéndose algunas de ellas como enfermedades desatendidas u olvidadas. Son gusanos parásitos de cuerpo alargado con simetría bilateral que incluyen en su ciclo de vida un hospedero definitivo y uno o varios intermediarios. El termino helmintos contiene diversos Phyla: el Phyla Platyhelminthes, que incluye a las clases Trematoda y Cestoda; el Phyla Nematoda, que incluye las clases Secernetea, y Adenophorea y por último el Phyla Annelida, que incluye las clases Oligochaeta, Hirudinea, entre otras. Los Phyla más importantes en cuanto a parásitos que afectan la salud humana y animal son los Platyhelminthes y Nematoda.

De hace unos años a la fecha ha tomado gran importancia el estudio de las ómicas, término que se refiere a varios campos, incluyendo: la genómica, el conjunto de genes; transcriptómica, el conjunto de ARN mensajeros de esos genes; proteómica, el conjunto de todas las proteínas que se expresan en un momento, en un organismo o en un tipo celular; metabolómica, el conjunto de los diferentes metabolitos existentes en un organismo o en un tipo celular, con diversas naturalezas químicas.

El estudio de la genómica, y posteriormente de la proteómica, de diferentes organismos ha sido posible gracias al desarrollo de las técnicas en biología molecular, entre ellas, la obtención del ADN recombinante de proteínas de interés biológico, clínico y farmacéutico. Haciendo un poco de historia, en el año 1982 se logró el primer fármaco, utilizando la técnica mencionada. A partir del año 1990 inicia el Proyecto del Genoma Humano que contó con la participación de universidades de los EUA, Reino Unido, Francia, Alemania, China y Japón. No es hasta 1999 en que se reporta la secuencia del cromosoma 22 del humano, revolucionando los estudios a nivel molecular. En el año 2001 se publica el primer borrador de la secuencia del genoma humano y finalmente en el año 2003 se termina de secuenciar completamente.

Es pertinente mencionar que los avances logrados hoy en día en la secuenciación de cualquier organismo son gracias a la revolución tecnológica que se produjo a partir del año 2004 con las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de ADN, incluyendo la pirosecuenciación por la tecnología 454, GS20 y Titanium, el secuenciador Solexa/Illumina, Illumina GAI e Illumina Hi-Seq 2000 y la plataforma de secuenciación SOLiD, entre otros. Esta revolución tecnológica permitió abaratar los costos de secuenciación de manera importante, además de aumentar el número de lecturas de ADN en muy poco tiempo, lo que ha

Infectología molecular

incrementado de manera considerable el interés y la posibilidad de la comunidad científica en abrirse el estudio de la genómica de manera universal.

Dentro de los proyectos genómicos de helmintos se han secuenciado alrededor de 94 genomas, incluyendo dentro de los nemátodos a *Ascaris suum*, *Trichiuris suis*, *Trichinella spiralis*, *Brugya malayi*, dentro de los trematodos a *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepática*, y dentro de los céstodos a *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus granulosos*, *Hymenolepis microstoma* y *Taenia solium*. El genoma de estos cuatro cestodos se reportó recientemente por investigadores de varios países incluyendo un importante grupo de investigadores mexicanos, nombrado el “Consortio para el estudio del Genoma de *Taenia solium*”, constituido por investigadores de diferentes entidades de la Universidad Nacional Autónoma de México (Tsai et al., 2013).

El conocimiento del genoma de los parásitos ha permitido profundizar en las bases moleculares y los mecanismos subyacentes a su especificidad con los hospederos, en un mejor conocimiento de su metabolismo y fisiología, así como en la identificación de nuevos inmunógenos para diagnóstico, vacunas y desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento y control de la enfermedad. Asimismo, ha permitido visitar viejos temas pero con herramientas más sofisticadas para profundizar en el conocimiento de la relación que establece el parásito con su hospedero, demostrando en general que estos organismos tienen sus vías metabólicas reducidas, reforzando el concepto establecido de parasitismo. Por otra parte, también se han identificado moléculas inmunomoduladoras, que le permiten al parásito controlar la respuesta inmune del hospedero, así como otras relacionadas con el proceso de invasión y migración a los diferentes tejidos y órganos. Por ejemplo, para el caso de la *Taenia solium*, se observó que aunque el parásito tiene toda la maquinaria enzimática para la síntesis de glucosa y ácidos nucleicos, así como para la transcripción y otros procesos fisiológicos importantes, carece de las vías necesarias para la síntesis de aminoácidos y ácidos grasos, entre otras. Sin embargo, es capaz de metabolizarlos (Tsai et al., 2013). Igualmente se identificaron moléculas inhibitoras de proteasas del hospedero como cistatinas y serpinas que actúan como inmunomoduladoras y otras involucradas en migración como la enolasa.

Otro de los aspectos que ha permitido abordar el conocimiento del genoma de parásitos helmintos ha sido la manipulación genética de los mismos (Moguel et al., 2015a). Además, se han comenzado a realizar ensayos para evaluar la función de determinada proteína a través del silenciamiento de genes. El desarrollo de técnicas para la manipulación genética se ha tornado relevante en la biología de gusanos planos, en los cuales se han identificado y caracterizado regiones que controlan la expresión de genes exógenos (Hoffmann et al. 2014; Beckmann y Grevelding 2012; Kalinna y Brindley 2007; Rinaldi et al. 2012a; Rinaldi et al. 2012b). Los mayores avances en transfección transitoria y estable se han reportado para el género *Schistosoma* (Boyle y Yoshino 2003; Pearce y Freitas 2008; Yang et al. 2010). En el caso de los cestodos, solo existen escasos reportes sobre transfección transitoria en *Echinococcus multilocularis*, *Hymenolepis microstoma* y *Moniezia expansa* (Brehm y Spiliotis 2008; Pierson et al. 2010; Pouchkina-Stantcheva et al. 2013; Spiliotis et al. 2008; Spiliotis et al. 2010). En cuanto a los tenidos, recientemente se reportó por primera vez la transfección transitoria de genes heterólogos en cisticercos de *Taenia crassiceps* (Moguel et al., 2015b).

Como resultado de los proyectos genómicos se han realizado esfuerzos internacionales como la iniciativa para caracterizar 50 parásitos helmintos, desarrollada en el Wellcome Trust Sanger Institute del Reino Unido (<https://www.sanger.ac.uk/research/initiatives/globalhealth/research/helminthgenomes/>). Esta

Tópicos selectos de biomedicina

base de datos aporta a la comunidad científica internacional una herramienta de acceso rápido a los genomas de estos organismos, lo que es una referencia de alta calidad para un subconjunto de helmintos que incluyen patógenos humanos clave como tricocéfalos, oxiuros, esquistosomas y Taenias. Otro esfuerzo es el desarrollado en la Universidad de Washington, que han desarrollado una herramienta bioinformática conformada por una base de datos de genomas de diferentes gusanos (http://helminth.net/HN_frontend.cgi).

En relación a la proteómica, se han abordado diferentes aspectos como conocer el patrón de proteínas que expresa el parásito en sus diferentes etapas del ciclo de vida, contribuyendo con nuevo conocimiento en el metabolismo y fisiología de estos organismos lo que también permite seleccionar blancos específicos útiles ya sea para el diagnóstico o el control de la parasitosis. También se ha utilizado esta herramienta para estudiar que proteínas secreta el parásito y conocer que papel pudieran tener en la relación hospedero parásito. Los resultados obtenidos de estos estudios son de muchísima utilidad para la comunidad biomédica nacional e internacional, en las áreas de la biología, la clínica, la farmacología, diagnóstico y tratamiento, ya que es una fuente de innumerables proyectos de investigación que sin duda contribuirán al avance de estas áreas en el desarrollo de nuevos métodos para combatir a los parásitos.

Cabe mencionar que algunos de estos proyectos proteómicos que se alimentan de los genómicos ya se vienen desarrollando en varios de nuestros laboratorios. Para el caso de la *T. solium*, utilizando herramientas proteómicas, recientemente, se reportó que entre el 11 al 13% de las proteínas que el cisticercosoma tiene proceden del cerdo (Navarrete et al. 2014), lo que habla de la estrecha relación que se establece entre el parásito y su huésped. También se han desarrollado estudios utilizando la inmunoproteómica para identificar nuevos antígenos específicos de *T. solium* que podrían contribuir al mejoramiento de los métodos actuales de diagnóstico (Díaz Masmela, 2013).

En conclusión, las ciencias ómicas están contribuyendo de manera notable al conocimiento de la biología de los parásitos helmintos y de su relación con el hospedero, lo que indudablemente repercutirá en el control de estas enfermedades que aún son un problema de salud pública y económico en países en vía de desarrollo.

REFERENCIAS

- Beckmann S, Grevelding CG. 2012. Paving the way for transgenic schistosomes Parasitology 139:651-668.
- Boyle JP, Yoshino TP. 2003. Gene manipulation in parasitic helminths Int J Parasitol 33:1259-1268.
- Brehm K, Spiliotis M. 2008. Recent advances in the in vitro cultivation and genetic manipulation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes and germinal cells Exp Parasitol 119:506-515.
- Díaz-Masmela Y, Fragoso G, Ambrosio JR, Mendoza-Hernández G, Rosas G, Estrada K, Carrero JC, Sciutto E, Lacleite JP, Bobes RJ. 2013. Immunodiagnosis of porcine cysticercosis: identification of candidate antigens through immunoproteomics. Vet J 198(3):656-60.
- Hoffmann KF, Brindley PJ, Berriman M. 2014. Medicine. Halting harmful helminths. Science 346:168-169.
- Kalinna BH, Brindley PJ. 2007. Manipulating the manipulators: advances in parasitic helminth transgenesis and RNAi. Trends Parasitol 23:197-204.

- Moguel B, Bobes RJ, Carrero JC, Laclette JP. 2015a. Transfection of Platyhelminthes. *Biomed Res Int* 206161.
- Moguel B, Moreno-Mendoza N, Bobes RJ, Carrero JC, Chimal-Monroy J, Díaz-Hernández ME, Herrera-Estrella L, Laclette JP. 2015b. Transient transgenesis of the tapeworm *Taenia crassiceps*. *Springerplus* 15; 4:496.
- Navarrete-Perea J, Moguel B, Mendoza-Hernández G, Fragoso G, Sciutto E, Bobes RJ, Laclette JP. 2014. Identification and quantification of host proteins in the vesicular fluid of porcine *Taenia solium* cysticerci. *Exp Parasitol* 143:11-7.
- Pearce EJ, Freitas TC. 2008. Reverse genetics and the study of the immune response to schistosomes *Parasite Immunol* 30:215-221.
- Pierson L, Mousley A, Devine L, Marks NJ, Day TA, Maule AG. 2010. RNA interference in a cestode reveals specific silencing of selected highly expressed gene transcripts *Int J Parasitol* 40:605-615.
- Pouchkina-Stantcheva NN, Cunningham LJ, Hrcckova G, Olson PD. 2013. RNA-mediated gene suppression and in vitro culture in *Hymenolepis microstoma*. *Int J Parasitol* 43:641-646.
- Rinaldi G, Eckert SE, Tsai IJ, Suttiprapa S, Kines KJ, Tort JF, Mann VH, Turner DJ, Berriman M, Brindley PJ. 2012a. Germline transgenesis and insertional mutagenesis in *Schistosoma mansoni* mediated by murine leukemia virus *PLoS Pathog* 8:e1002820.
- Rinaldi G, Suttiprapa S, Tort JF, Folley AE, Skinner DE, Brindley PJ. 2012b. An antibiotic selection marker for schistosome transgenesis *Int J Parasitol* 42:123-130.
- Spiliotis M, Lechner S, Tappe D, Scheller C, Krohne G, Brehm K. 2008. Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacystode vesicles *Int J Parasitol* 38:1025-1039.
- Spiliotis M, Mizukami C, Oku Y, Kiss F, Brehm K, Gottstein B. 2010. *Echinococcus multilocularis* primary cells: improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference *Mol Biochem Parasitol* 174:83-87.
- Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, Tracey A, Bobes RJ, Fragoso G, Sciutto E, Aslett M, Beasley H, Bennett HM, Cai J, Camicia F, Clark R, Cucher M, De Silva N, Day TA, Deplazes P, Estrada K, Fernández C, Holland PW, Hou J, Hu S, Huckvale T, Hung SS, Kamenetzky L, Keane JA, Kiss F, Koziol U, Lambert O, Liu K, Luo X, Luo Y, Macchiaroli N, Nichol S, Paps J, Parkinson J, Pouchkina-Stantcheva N, Riddiford N, Rosenzvit M, Salinas G, Wasmuth JD, Zamanian M, Zheng Y; *Taenia solium* Genome Consortium, Cai X, Soberón X, Olson PD, Laclette JP, Brehm K, Berriman M. 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496 (7443):57-63.
- Yang S, Brindley PJ, Zeng Q, Li Y, Zhou J, Liu Y, Liu B, Cai L, Zeng T, Wei Q, Lan L, McManus DP. 2010. Transduction of *Schistosoma japonicum* schistosomules with vesicular stomatitis virus glycoprotein pseudotyped murine leukemia retrovirus and expression of reporter human telomerase reverse transcriptase in the transgenic schistosomes. *Mol Biochem Parasitol* 174:109-116.

Potencial zoonótico de *Giardia intestinalis* en México

PONCE-MACOTELA M, RUFINO-GONZÁLEZ Y, MARTÍNEZ GORDILLO MN

Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría

INTRODUCCIÓN

La giardiasis es la protozosis intestinal que se reporta con más frecuencia a nivel mundial (OMS, 1988). Produce diarrea, dolor abdominal y malabsorción; en los niños es devastadora porque provoca retraso en el desarrollo físico e intelectual (Berkman et al., 2002). Por su alta prevalencia en países en desarrollo y su impacto en la población se le ubicó en el grupo de las enfermedades del rezago (Savioli et al., 2006). Los trofozoítos del grupo morfológico *G. intestinalis* obtenidos de diferentes hospederos son similares. Por esta razón, se han utilizado diferentes estrategias moleculares para diferenciarlos; actualmente se reconocen ocho ensambles (A-H); dos de ellos (A y B) con potencial zoonótico (Monis et al 1999; Read et al., 2004; Lasek-Nesselquist et al., 2010).

TAXONOMÍA

El uso de nuevas herramientas muestra el constante cambio en la taxonomía de los protozoarios y *Giardia* no es la excepción. Actualmente *Giardia intestinalis* (*G. duodenalis*, *G. lamblia*) se ubica en el subreino biciliata porque los genes de las enzimas timidilato sintetasa y dihidrofolato reductasa están fusionados. En el infrareino excavata ya que desciende de ancestros con dos cilios y un canal ventral alimenticio (Cavalier-Smith. 2003).

- Reino Protozoa
 - Subreino Biciliata
 - Infrareino Excavata
 - Phylum Metamonada
 - Subphylum Trichozoa
 - Superclase Eopharyngia
 - Clase Trepomonadea
 - Subclase Diplozoa

HISTORIA

Se atribuye a Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) la primera descripción de *Giardia*. En una carta que envió a Robert Hook (1681), manifestó que en una de sus muestras diarreicas observó unos "animalículos" del tamaño de los eritrocitos, más largos que ancho, aplanados y con patitas que se movían de forma vigorosa. Pero, el género y la especie *Giardia lamblia* se erigió en honor a Alfred Mathieu Giard (1846-1908) y a Vilem Dusan Lamb (1824-1895) (Boreham et al., 1990).

ESPECIES DE *GIARDIA*

En la primera mitad del siglo XX se describieron tantas especies como hospederos había; sin embargo, Filice (1952) basándose en la forma del cuerpo medio y la morfología de los trofozoítos describió tres especies: *G. agilis* (anfibios), los trofozoítos son delgados y alargados, los cuerpos medios tienen la forma de gota de lágrima y se encuentran a lo largo del eje del cuerpo; *G. muris* (roedores), los trofozoítos son piriformes y los cuerpos medios son redondos; *G. duodenalis* infecta al hombre y otros mamíferos, los trofozoítos son piriformes y los cuerpos medios en forma de uña de martillo. Posteriormente se describieron tres nuevas especies: *G. psittaci* (aves) (Erlandsen & Bemrick, 1987) y *G. microti* (rata) tienen cuerpos medios en forma de uña de martillo, la primera carece del flanco ventrolateral y la segunda tiene dos trofozoítos dentro del quiste (van Keulen et al., 1998); *G. ardeae* (aves), tiene los cuerpos medios pleomórficos (parecidos a *G. muris* y a *G. duodenalis*) y carece de un flagelo caudal (Erlandsen et al., 1990). En este trabajo nos referiremos al grupo morfológico *G. intestinalis*.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Inicialmente se consideró que *Giardia* era un comensal, probablemente porque muchos pacientes son asintomáticos. Actualmente, sabemos que el cuadro clínico es muy diverso: desde los casos asintomáticos hasta sintomáticos agudos o crónicos. La fase aguda se presenta, desde los 6-15 días después de la infección, con dolor epigástrico transprandial, diarrea fétida, esteatorrea, hiporexia meteorismo, flatulencia, náuseas, vómito y pérdida de peso. En algunos casos la infección se puede auto-limitar en 2 a 4 semanas. En la fase crónica el cuadro clínico se exagera: hay malabsorción de grasas, carbohidratos, proteínas, vitaminas (A y B12) y micronutrientes (hierro y zinc); la diarrea es intermitente; se registra pérdida de peso y déficit intelectual (Cotton et al., 2011; Ankarklev et al., 2010).

Durante mucho tiempo se consideró que los trofozoítos solamente viven en la luz intestinal y sobre las microvellosidades del intestino delgado (Eckmann & Gillin, 2001). Existen algunos reportes que muestran trofozoítos de *Giardia* invadiendo la mucosa intestinal; sin embargo, como el fenómeno no se reprodujo, la comunidad científica no lo aceptó. En 2014 publicamos el caso de un paciente pediátrico con intolerancia a la lactosa que presentó giardiasis intraepitelial. De las heces de este paciente se obtuvieron quistes de *Giardia*, se desenquistaron *in vitro* y se obtuvo el primer aislado de *Giardia* (INP-HGINV) con capacidad invasiva (Martínez-Gordillo et al., 2014).

Tópicos selectos de biomedicina

Recientemente, demostramos en un modelo *in vivo* (*Meriones unguiculatus*) que los trofozoítos de este aislado invaden la mucosa y submucosa intestinal. Reproduciendo así los postulados de Koch (Reynoso-Robles et al., 2015). La réplica de la invasión duodenal rompe con el paradigma de la incapacidad de *Giardia* para invadir el epitelio intestinal y de su localización exclusivamente intraluminal. No sabemos cuál es la prevalencia de *Giardia* invasora porque el método diagnóstico de elección es el coproparasitoscópico. Quizá la variabilidad en las manifestaciones clínicas se debe a la presencia o ausencia de trofozoítos invasivos; sin embargo, para evidenciarlos será necesario tomar biopsias duodenales.

PREVALENCIA

La giardiasis es endémica en países en desarrollo y epidémica en países desarrollados (Feng & Xiao 2011; Cifuentes et al., 2004). Un estudio de seroprevalencia sugiere que la giardiasis es endémica en México, ya que se registró un 55% de seropositividad en poblaciones con nivel socioeconómico alto, medio o bajo, de diferentes regiones del país (Cedillo-Rivera et al., 2009)

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Debido a que los trofozoítos de *G. intestinalis* que parasitan al hombre y a otros mamíferos no se pueden discriminar morfológicamente, se han utilizado diferentes técnicas para poder diferenciarlos y establecer marcadores de patogenicidad; entre éstas se usaron: inmunológicas (Nash et al., 1985a), bioquímicas (Meloni et al., 1988) y moleculares, tales como: hibridación, amplificación de genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación (Nash et al., 1985b; Ey et al., 1992; Ey et al., 1998; Monis et al., 1999). En la genotipificación de este parásito se han utilizado genes altamente conservados [18S rRNA, factor de elongación 1 alfa (*fe1a*)] o menos conservados [proteínas variables de superficie (*tsa417*, *tsp11*); las enzimas glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y triosa fosfato isomerasa (*tpi*), y β -giardina].

Históricamente con estas técnicas se describieron los grupos genéticos "Polaco" y "belga" en Europa (Homan et al., 1992); 1-2 y 3-4 en Norte América (Nash et al., 1985b) y ensamblajes A - B en Australia (Mayerhofer et al., 1995); Sorprendentemente, con las secuencias de los genes *tsa 417*, *tsp11* y *gdh* se demostró la correlación del grupo Polaco con el grupo A y el grupo Belga con el grupo B (Monis et al., 1996). Hasta el momento se han descrito ocho ensamblajes: los ensamblajes A (A1, A2) y B (B3, B4) son zoonóticos, E (artiodáctilos), F (felinos), C y D (cánidos), G (rata), H (mamíferos marinos) (Monis et al., 1999; Read et al., 2004; Lasek-Nesselquist et al., 2010).

Monis et al (1999) demostraron mediante la secuenciación de cuatro genes (18S rRNA, *gdh*, *tpi* y *fe1a*), que los trofozoítos de los siete ensamblajes (A-G), con cuerpo medio en forma de uña de martillo son monofiléticos, es decir, que provienen de una población ancestral común.

GENOTIPOS PREDOMINANTES DE *GIARDIA* EN MÉXICO

La genotipificación de *Giardia* en México se remonta a los primeros años del siglo XXI. Se encontraron nueve reportes de genotipificación de *Giardia* de seres humanos, fundamentalmente de niños. Seis de éstos incluyen animales de compañía. Solamente hay un estudio que genotipifica muestras de *Giardia* procedentes de bovinos y ovinos. La mayoría de los estudios de genotipificación se realizaron con DNA de quistes, probablemente porque se ha planteado que el medio de cultivo selecciona genotipos (Andrews et al., 1992). Para la genotipificación se utilizó la PCR-RFLP's o secuenciación de los genes *vsp* 417, *tsp*11, *gdh*, *tpi*, β -giardina, 16S rRNA o múltiplex.

Las muestras de humanos procedían del Distrito Federal, Sinaloa y Yucatán. En las 138 muestras de *Giardia* genotipificadas hay predominio del Ensamble A, genotipo A1. Con estos marcadores moleculares no se observó alguna correlación con el cuadro clínico; aunque, en un estudio se encontró el ensamble B en seis muestras procedentes de niños sintomáticos. Este dato concuerda con el reportado por Homan & Mank (2001) quienes encontraron el Ensamble B en pacientes con diarrea persistente. Por otro lado, Cedillo-Rivera y col (2003) encontraron el grupo genético A1 en pacientes sintomáticos y asintomáticos; mientras que Ponce-Macotela et al (2002) detectaron el genotipo A2 en sintomáticos y asintomáticos. Los resultados son controversiales, por tal motivo, es necesario buscar otros marcadores moleculares de patogenicidad.

Por primera vez se reportó un aislado axénico de *Giardia* procedente de un paciente con intolerancia a la lactosa y giardiasis intraepitelial; tanto los quistes como los trofozoítos pertenecen al grupo genético A2. Los resultados de la genotipificación de este aislado son importantes porque en este caso el medio de cultivo no seleccionó al grupo genético A2, ni a los trofozoítos invasores, ya que replicaron la invasión al epitelio intestinal.

En esta revisión el grupo genético A1 también se encontró en la mayoría de las muestras de cánidos, bovinos y ovinos. En ninguna de las muestras procedentes de los cánidos se encontraron los ensambles C y D (característicos de este grupo).

Las 10 muestras de *Giardia* de ovinos y bovinos fueron del Estado de México, Morelos, Hidalgo o Querétaro; solo dos de bovinos presentaron el ensamble E, los otros fueron del ensamble A, genotipo A1 o presentaron mezcla de A1+B. Tabla 1.

Los datos demuestran predominio de ensambles zoonóticos de *Giardia* en humanos y animales. El más frecuente fue el ensamble A con el grupo genético A1, sigue en frecuencia el grupo genético A2 y después el ensamble B con el grupo genético B3. Llama la atención que las mascotas estuvieran parasitadas con *Giardia* del ensamble A. Los resultados sugieren que los artiodáctilos y cánidos están sujetos a por los menos tres tipos de transmisión: a) infección con quistes de *Giardia* de los ensambles A y B, que están en humanos, la ruta antroponótica, b) infección con quistes de los ensambles A y B que están infectando animales y c) infección con quistes de *Giardia* de los ensambles C y D cuasiespecíficos de cánidos o del ensamble E más frecuente en ovinos y bovinos.

Tópicos selectos de biomedicina

CONCLUSIONES

La alta seroprevalencia a *Giardia* y los resultados de genotipificación, con estos marcadores moleculares, sugieren que hay transmisión de *Giardia* de humanos a cánidos, ovinos y bovinos, (la ruta antroponótica) por lo que este genotipo es capaz de generar la ruta inversa es decir, presentar transmisión zoonótica. El tema es fuente de debate; porque, *Giardia* es un protozooario eurixénico con gran capacidad adaptativa. Es necesario incluir más muestras procedentes de animales y humanos. Se deben buscar nuevos marcadores para genotipificación con base en nuevas secuencias que permitan estratificar nuevos grupos genéticos.

TABLA 1. Genotipos de *Giardia intestinalis* en México

Estado	Humanos								Animales								DNA Q/T	Genes	Autor
	No	A	A1	A2	A3	B3	G	A1+A2	No	A	A1	A2	A3	A4	A1+B3	E+B3			
Distrito Federal	1			1*					-								Q/T	<i>Vsp, gdh</i>	Martinez-Gordillo et al., 2014
Yucatán	33		27**			6*			-								Q	<i>Tpi, gdh</i>	Torres-Romero et al., 2014
Distrito Federal	8		2	4			1	1	8 C		8						Q	Multiplex	Eligio-Garcia et al., 2008a
Sinaloa	12		5	7					19 C		10	9					Q	β -giardina	Eligio-Garcia et al., 2008b
Morelos									2 O						2		T	<i>gdh</i>	Otero-Negrete et al., 2011
Edo Mex									1 O		1								
Hidalgo									2 O						2 O				
Querétaro									4 B		1 B				1 B	2 B			
Distrito Federal	13	2*	3**	2*, 2**	3*, 1**				11 C	7			4		1		Q	16 S rRNA secuenciación	Eligio-Garcia et al., 2005
Distrito Federal	9		7*		2*				5 C		3		1		1		Q	β -giardina, secuenciación	Lalle et al., 2005
Distrito Federal	26		6*, 20**						-								T	<i>gdh</i>	Cedillo-Rivera et al., 2003
Distrito Federal	17§								4 C§								Q	16S rRNA	Eligio et al., 2002
Distrito Federal	19			11*, 8**					2 C		2						T	<i>Vsp 417, gdh, multiplex</i>	Ponce-Macotela et al., 2002
									1 F		1								

No: Número de muestras genotipificadas; Q/T: Quistes o Trofozoítos; *: Sintomáticos; **: Asintomáticos; C: Cánidos; F: felinos; O: Ovinos; B: Bovinos; - : Sin muestras; §: Sin ubicación en estos genotipos.

REFERENCIAS

- Andrews RH, Chilton NB, Mayrhofer G. Selection of specific genotypes of *Giardia intestinalis* by growth in vitro and in vivo. Parasitol. 1992;105:375-386.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nat Rev Microbiol. 2010;8:413-422.

- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. Int J Parasitol. 2011;41:925-933.
- Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. Lancet. 2002;359:564-571.
- Boreham PFL, Upcroft JA, Upcroft P. Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology. Int J Parasitol. 1990;20:479-487.
- Cavalier-Smith T. Protist phylogeny and the high-level classification of protozoa. Europ J Protistol. 2003;39:338-348.
- Cedillo-Rivera R, Darby JM, Enciso-Moreno JA, Ortega-Pierres G, Ey PL. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. Parasitol Res. 2003;90:119-123.
- Cedillo-Rivera R, Leal YA, Yépez-Mulia L, Gómez-Delgado A, Ortega-Pierres G, Tapia-Conyer R, Muñoz O. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2009;80:6-10
- Cifuentes E, Suárez L, Espinosa M, Juárez-figueroa L, Martínez-Palomo A. Risk of *Giardia intestinalis* infection in children from an artificially recharged groundwater area in Mexico city. Am J Trop Med Hyg. 2004;71:65-70
- Comité OMS d'Experts. Importance des parasitoses intestinales en santé publique. Bull World Health Organ 1988;1: 23-34.
- Eckmann L, Gillin FD. Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial mucosal interactions. I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001;280:G1-G6
- Eligio GL, Galván SC, Jiménez CE. Distancia filogenética de aislados de *Giardia intestinalis* de niños sintomáticos y asintomáticos. Re Inv Clin. 2002;54:113-118.
- Eligio-García L, Cortés-Campos A, Jiménez-Cardoso E. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. Parasitol Res. 2005; 97:1-6
- Eligio-García L, Cortés-Campos A, Jiménez-Cardoso E. Classification of *Giardia intestinalis* isolates by multiple polymerase chain reaction (multiplex). Parasitol Res. 2008a;10:797-800.
- Eligio-García L, Cortes-Campos A, Cota-Guajardo S, Gaxiola S, Jiménez-Cardoso C. Frequency of *Giardia intestinalis* assemblages isolated from dogs and humans in a community from Culiacan, Sinaloa, Mexico using b-giardin restriction gene. Vet Parasitol. 2008b;156:205-209.
- Erlandsen SL, Bemrick WL. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. J Parasitol. 1987;73:623-629.
- Erlandsen SL, Bemrick WL, Wells CL, Feely DE, Knudson LL, Campbell SR, van Keulen H, Jarroll EL. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J Parasitol. 1990;76:717-724.
- Ey PL, Khanna K, Andrews RH, Manning PA, Mayrhofer G. Distinct genetic groups of *Giardia intestinalis* distinguished by restriction fragment length polymorphisms. J Gen Microbiol. 1992;138: 2629-2637.
- Ey PL, Darby JM, Mayrhofer G. Comparison of *tsa417*-like variant-specific surface protein (VSP) genes in *Giardia intestinalis* and identification of a novel locus in genetic group II isolates. Parasitology. 1998;117:445-455.

Tópicos selectos de biomedicina

- Feng Y & Xiao L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2011;24:110-114.
- Filice FP. Studies on the cytology and the life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ. California Publ. Zool. 1952;57:53-146.
- Homan WL, van Enckevort FH, Limper L, van Eys GJ, Schoone GJ, Kasprzak W, Majewska AC, van Knapen F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and DNA probes. Parasitol Res. 1992;78:316-323.
- Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. Int J Parasitol. 2001;31:822-826.
- Lalle M, Jimenez-Cardosa E, Caccio SM, Pozio S. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and dogs from Mexico using a b-Giardin nested polymerase chain reaction assay. J Parasitol. 2005;91:203-205.
- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. Int J Parasitol. 2010; 40:1063-1074.
- Martínez-Gordillo MN, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Montijo-Barrios E, Ponce-Macotela M. Intraepithelial *Giardia intestinalis*: A case report and literature review. Medicine. 2014;93:1-5
- Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of *Giardia* isolates from human into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. Parasitology. 1995;111:11-17.
- Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RC. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from human and felines. Am J Trop Med Hyg. 1988;38:65-73
- Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, and Ey PL. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. Parasitology. 1996;112:1-12.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. Mol Biol Evol. 1999;16:1135-1144.
- Nash TE, Keister DB. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. J Infect Dis. 1985a;152:1166-1171.
- Nash TE, McCutchan T, Keister D, Dame JB, Conrad JD, Gillin FD. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. J Infect Dis. 1985b;152:64-73.
- Otero-Negrete JJ, Ibarra-Velarde F, Martínez-Gordillo MN, Ponce-Macotela M. Prevalence of *Giardia intestinalis* and zoonotic genotype predominance in small scale sheep and cattle farms of five states of the Mexican Republic. Vet Méx 2011;42:219-226.
- Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN, Bermúdez-Cruz RM, Salazar-Schettino PM, Ortega-Pierres G, Ey, P. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. Int J Parasitol. 2002;32:1201-1202.
- Read CM, Monis PT, Thompson RCA. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol. 2004;4:125-130.
- Reynoso-Robles R, Ponce-Macotela M, Rosas-López LE, Ramos-Morales A, Martínez-Gordillo MN, González-Maciél A. The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an *in vivo* model. Sci Rep. 2015;5:15168

Infectología molecular

- Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the «Neglected Diseases Initiative». *Trends Parasitol.* 2006;22:203-208.
- Torres-Romero JC, Euan-Canto Ade J, Benito-González N, Padilla-Montaña N, Huchin-Chan C, Lara-Riegos J, Cedillo-Rivera R. Intestinal parasites and genotyping of *Giardia duodenalis* in children: first report of genotype B in isolates from human clinical samples in Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:388-390
- Van Keulen H, Feely DE, Macechko PT, Jarroll EL, Erlandsen SL. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. *J Parasitol.* 1988;84:294-300.

Tópicos selectos de biomedicina

Genómica y biología molecular en el estudio de patogenicidad de *Escherichia coli* enteropatógenas emergentes

JUNAID IQBAL¹, CHENGXIAN ZHANG¹, AAMER IMDAD¹, NIHARIKA MALVIYA¹, MONICA ARIAS², N. TATIANA SANCHEZ², ANA E. FARFÁN GARCIA² AND OSCAR G. GÓMEZ-DUARTE¹

¹Vanderbilt University School of Medicine, Division of Pediatric Infectious Diseases, Nashville, TN; ²CliniUDES Research Group, Bacteriology Program, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia

La enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños menores de 5 años es una de las causas más importantes de mortalidad en países de bajos recursos en África y el Sudeste Asiático. La morbilidad por EDA, en cambio, afecta a la población pediátrica de África, Asia, Latino América, y países industrializados ¹⁻⁴. Entre 0.8 a 2 millones de niños menores de 5 años mueren en el mundo a causa de EDA siendo esta la segunda causa única de muerte después de las infecciones respiratorias ⁵. Se estima que mil millones de episodios de diarrea ocurren anualmente en niños en el mundo ⁶. Los agentes infecciosos asociados a la alta morbilidad y mortalidad de la EDA incluyen virus, bacterias y en menor proporción parásitos ⁷.

Tabla 1. Tipos de *E. coli* intestinales patógenas

Patotipos ¹	Genotipo	Patogenicidad	Clinica
ETEC	Lth, sth, stp,	Aumento del AMPc y GMPc y apertura del CFTRA	Diarrea secretora
EPEC típica	LEE	Adherencia íntima y destrucción de microvellosidades (lesión A/D)	Diarrea líquida prolongada
EPEC atípica	LEE	Lesión A/D	Diarrea líquida prolongada
STEC	BFP	Adherencia localizada	
	Stx1, stx2, LEE ²	Inhibición de síntesis proteica Microtrombosis intravascular	Diarrea disintérica Síndrome hemolítico urémico
EAEC	AFF, PET, AggR	Lesión A/D Adherencia agregativa	Diarrea líquida
EIEC	T3SS	Invasión y diseminación celular	Diarrea disintérica
ADEC	DAA	Adherencia difusa	Diarrea líquida

¹*E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) típica y atípica, *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). ²La presencia de LEE en cepas de STEC se les denomina *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) y se asocian a lesión A/D

Infectología molecular

CARACTERÍSTICAS DE LAS *ESCHERICHIA COLI* INTESTINALES PATÓGENAS

Aunque cepas de *E. coli* diarreogénicas fueron reconocidas en 1889, la caracterización de sus mecanismos de patogenicidad y su posterior clasificación en las seis cepas que hoy conocemos no fue posible por muchos años debido a que los ensayos de microbiología convencional no permitían distinguir *E. coli* patógenas de *E. coli* no patógenas. Los estudios basados en biología molecular, microscopía de luz, de fluorescencia y electrónica, y genómica han permitido elucidar los mecanismos de patogenicidad de cada uno de los patotipos entéricos de *E. coli*. Los seis tipos reconocidos de *E. coli* diarreogénicas son las *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Tabla 1)⁸. En la actualidad el diagnóstico y/o la vigilancia epidemiológica para la detección de estos agentes utiliza frecuentemente ensayos de amplificación de ADN los cuales reconocen genes de virulencia específicos para cada uno de los seis tipos de *E. coli* diarreogénicos descritos⁹⁻¹². Este tipo de ensayo no está disponible en la mayoría de países en vía de desarrollo lo cual ha limitado su utilización en vigilancia epidemiológica para evaluar el impacto que las cepas de *E. coli* diarreogénicas en población pediátrica con EDA¹³.

ETEC es el agente más frecuentemente asociado a EDA infantil en el mundo y el que está asociado con mayor mortalidad y morbilidad en niños menores de 5 años después de rotavirus¹⁴. Además, se le reconoce como el agente más frecuentemente asociado a la diarrea del viajero¹⁵. ETEC se define como aquellas cepas de *E. coli* que expresan la enterotoxina termolábil LT y/o la enterotoxina termoestable ST inductoras de diarrea secretora. Las ETEC colonizan el intestino humano mediante factores de colonización¹⁶. Más de 22 factores de colonización constituidos por pili y adhesinas no asociadas a pili, permiten la adherencia bacteriana a células intestinales, facilitando la colonización del intestino delgado.

La EPEC induce diarrea prologada preferencialmente en niños menores de un año y aunque se ha descrito mundialmente, su prevalencia más alta se reporta en Brasil¹⁷⁻¹⁹. EPEC se define como aquella *E. coli* que posee la isla de patogenicidad llamada locus de eliminación de microvellosidades intestinales LEE (por sus siglas en inglés) que codifica un sistema de secreción tipo III similar en estructura a los descritos en *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia pestis* y *Pseudomonas aeruginosa*^{20,21}. LEE codifica proteínas que una vez expresadas, son inyectadas dentro de células epiteliales de la mucosa intestinal para inducir polimerización de actina, adherencia íntima bacteriana, formación de pedestales en la superficie apical de las células intestinales, y destrucción de microvellosidades²². Dos grupos de EPEC han sido reportados con base en la presencia o ausencia de la fimbria tipo IV BFP (bundle-forming pilus) la cual está codificada en un plásmido de virulencia. Las EPEC típicas son aquellas que poseen el plásmido de virulencia que codifica BFP mientras que las EPEC atípicas son aquellas que carecen de dicho plásmido y no expresan BFP. El BFP induce adherencia bacteriana a la superficie de células epiteliales en un patrón denominado adherencia localizada²³.

La STEC induce diarrea con sangre en huéspedes susceptibles, y en algunos pacientes especialmente en edades extremas puede inducir síndrome hemolítico urémico, caracterizado por hemólisis, falla renal, y trombocitopenia²⁴. La STEC se caracteriza por expresar una toxina genéticamente y fenotípicamente similar a la toxina Shiga, descrita originalmente en *Shigella dysenteriae* tipo 1, que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en células eucariotas. La toxina está conformada por una subunidad A y cinco subunidades B, ésta última se une a receptores de, facilitando la internalización de la toxina con sus respectivas

Tópicos selectos de biomedicina

subunidades. La subunidad A altera la subunidad 28S ribosomal inhibiendo la síntesis de proteínas ²⁵. Otros mecanismos de acción asociados a la toxicidad celular de la toxina Shiga incluyen , la inducción de apoptosis mediante la activación directa o indirecta de las cascada de caspasas, y la activación de la expresión o liberación de citocinas como la IL-8, el factor estimulante de granulocitos y fagocitos (GM-CSF), y el factor de necrosis tumoral (TNF) ²⁶. El efecto microtrombótico de la toxina Shiga se manifiesta clínicamente como el síndrome hemolítico urémico, consistente en hemólisis, azotemia, y trombocitopenia, encefalopatía, y gastroenteritis disintérica ^{24,27}. Las cepas de STEC que más se asocian a esta enfermedad incluye un número relativamente reducido de serotipos, de los cuales el más frecuente es el O157:H7.

Las EIEC inducen una diarrea disintérica muy semejante a la *Shigella spp.* y afecta niños principalmente en países de bajos recursos ²⁸. EIEC posee un plásmido de virulencia codifica un sistema de secreción tipo III similar en estructura al de EPEC pero su función está dirigida a la inducción de invasión bacteriana de las células intestinales y su diseminación intercelular. EAEC induce diarrea líquida en niños y adultos en países en vía de desarrollo como también en países industrializados. Se ha descrito también como un agente importante de diarrea del viajero. EAEC se define como aquella *E. coli* que induce adherencia agregativa en células epiteliales la cual es mediada por la fimbria AFA. La EAEC necesita de otros factores de virulencia para inducir enfermedad, dichos factores no están claramente definidos en la actualidad pero se cree incluyen el factor de regulación global AggR, y varias enterotoxinas ^{29,30}. La DAEC es el patotipo menos caracterizado de todos y el grupo tal vez más heterogéneo ³¹. Se cree que induce diarrea líquida en niños pero su frecuencia en países en vía de desarrollo y en países industrializados no parece ser muy alta. Sus factores de virulencia asociados al fenotipo de adherencia difusa incluyen las fimbrias Afa, Dr, y Daa codificadas en operones con su mismo nombre los cuales se han detectado también en cepas de *E. coli* no patógenas ³².

Recientemente se han descrito cepas de *E. coli* patógenas intestinales emergentes. El caso más dramático corresponde a la cepa EAEC- STEC descrita en Alemania en el 2011 y responsable de un brote epidémico en Europa asociado a diarrea disintérica complicada con síndrome hemolítico urémico y con elevada mortalidad ^{33,34}. Estudios basados en análisis de secuencia de ADN genómico y estudios filogenéticos demostraron que esta cepa es una EAEC que adquirió los genes de la toxina-Shiga, además de otros factores de virulencia mediante transferencia horizontal de ADN ^{35,36}.

Infectología molecular

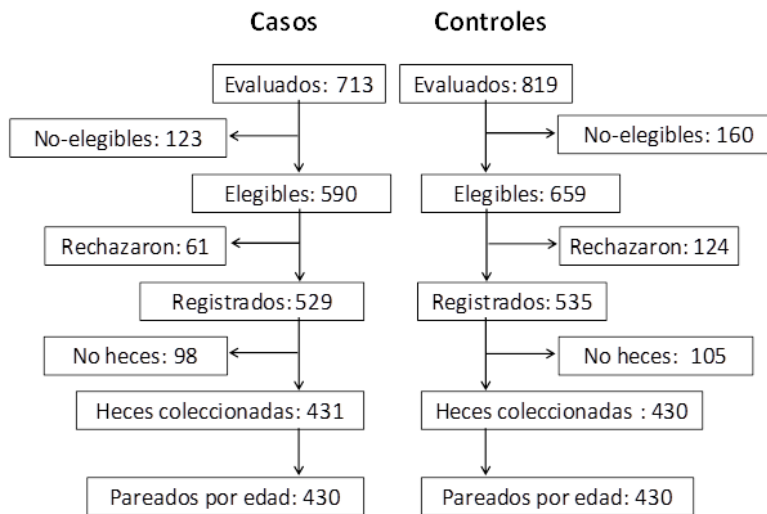


Figure 1. Registro de casos and controles en población pediátrica en Colombia

ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS PARA LA DETECCIÓN DE CASOS DE DIARREA POR *E. COLI* PATOGENAS

Estudios sobre la epidemiología de la EDA por *E. coli* diarreagénica son importantes porque determinan la frecuencia de estos agentes en la población, los factores de riesgo, los reservorios de la infección, y determinan el papel de los alimentos, el agua, y los animales en la transmisión de la infección. La gran mayoría de los estudios epidemiológicos sobre EDA por *E. coli* patógena incluye estudios observacionales descriptivos o analíticos. Dentro de los estudios observacionales descriptivos, los estudios de vigilancia epidemiológica han aportado información sobre incidencia, prevalencia, y mortalidad y sobre casos esporádicos de EDA severa. Estudios observacionales analíticos están destinados a comparar grupos de sujetos para obtener una estimación válida y precisa de la asociación de una relación causa-efecto. Estos estudios incluyen el estudio de casos y controles y el de cohortes. Entre los años 2010 y 2014 nuestro equipo ha realizado estudios de casos y controles en Colombia, en niños menores de cinco años. Los estudios, aprobados por los comités de ética de cada entidad participante, se iniciaron una vez un consentimiento informado fue obtenido y firmado por padres o acudientes de los niños participantes. A los niños registrados en el estudio se les aplicó un cuestionario para obtener información demográfica, historia clínica y factores de riesgo epidemiológico (Figura 1). A los casos se les preguntó sobre la historia clínica de la EDA actual. A todos los sujetos del estudio se les solicitó una muestra de materia fecal para estudios microbiológicos.

Tópicos selectos de biomedicina

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL LA PARA DETECCIÓN DE AGENTES MICROBIANOS

A partir de muestras fecales se aislaron e identificaron agentes microbianos diarreagénicos, incluyendo virus, bacteria y parásitos (Figure 2). Los métodos microbiológicos incluyeron cultivos bacterianos en agares selectivos para posterior identificación de agentes específicos como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter* y *E. coli* mediante pruebas bioquímicas. Los virus se detectaron mediante inmuno-ensayos o por amplificación de ADN mediante ensayo de PCR en tiempo-real (RT-PCR). La detección de parásitos se llevo a cabo mediante pruebas de microscopia y/o inmuno-ensayos. Para la detección de *E. coli* patógenas, se extrajo el ADN de aislamientos de *E. coli* mediante un protocolo de lisis con ebullición y posteriormente seguido de ensayos de PCR múltiple para detección de genes especificaos para cada una de los patotipos de *E. coli* diarreagénica. Análisis preliminar de las muestras demostró agentes bacterianos predominantemente *Salmonella*, agentes virales predominantemente Norovirus, y agentes parasitarios predominantemente *E. hystolitica* (Figure 3).

Los patotipos de *E. coli* fueron los mas frecuentes patógenos. Excepto por EAEC, los demás patotipos de *E. coli* predominaron mas en casos que en controles. EAEC fue el patotipo más frecuente, seguido de EPEC e ETEC. En los controles no se identificó EHEC. Se reportan *E. coli* emergentes que incluyen patotipos mixtos, aquellos con factores de virulencia de patotipos distintos y patotipos de *E. coli* con fenotipos adicionales como es la formación de biopelículas sobre superficies inertes y orgánicas.

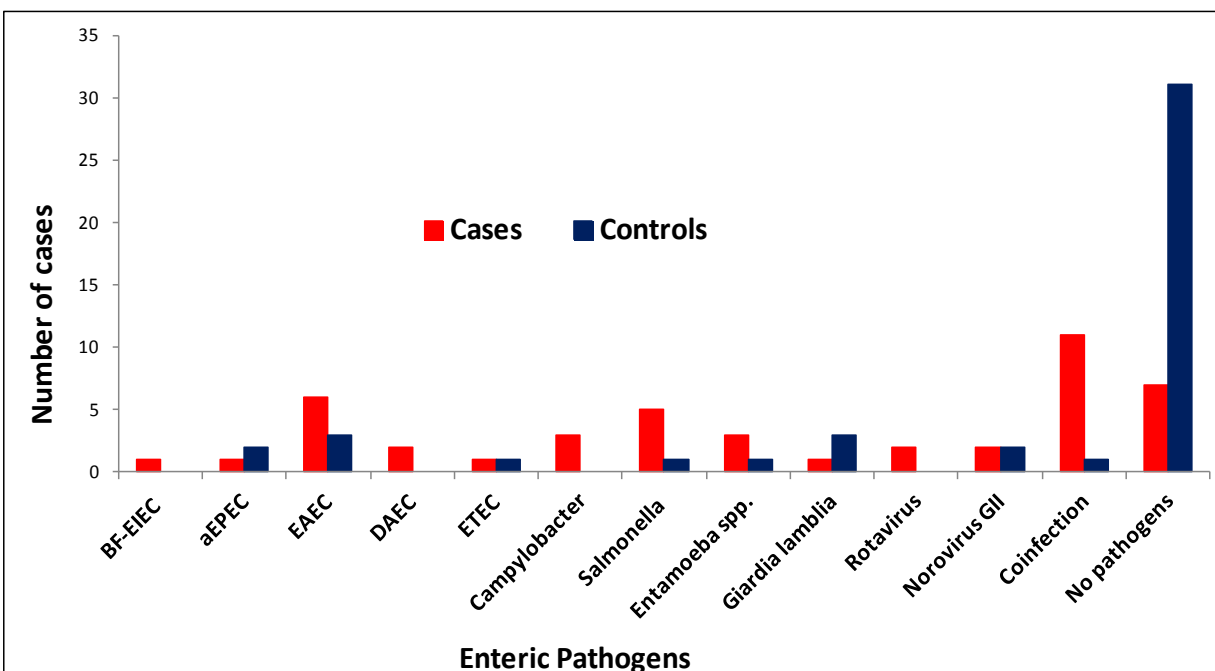
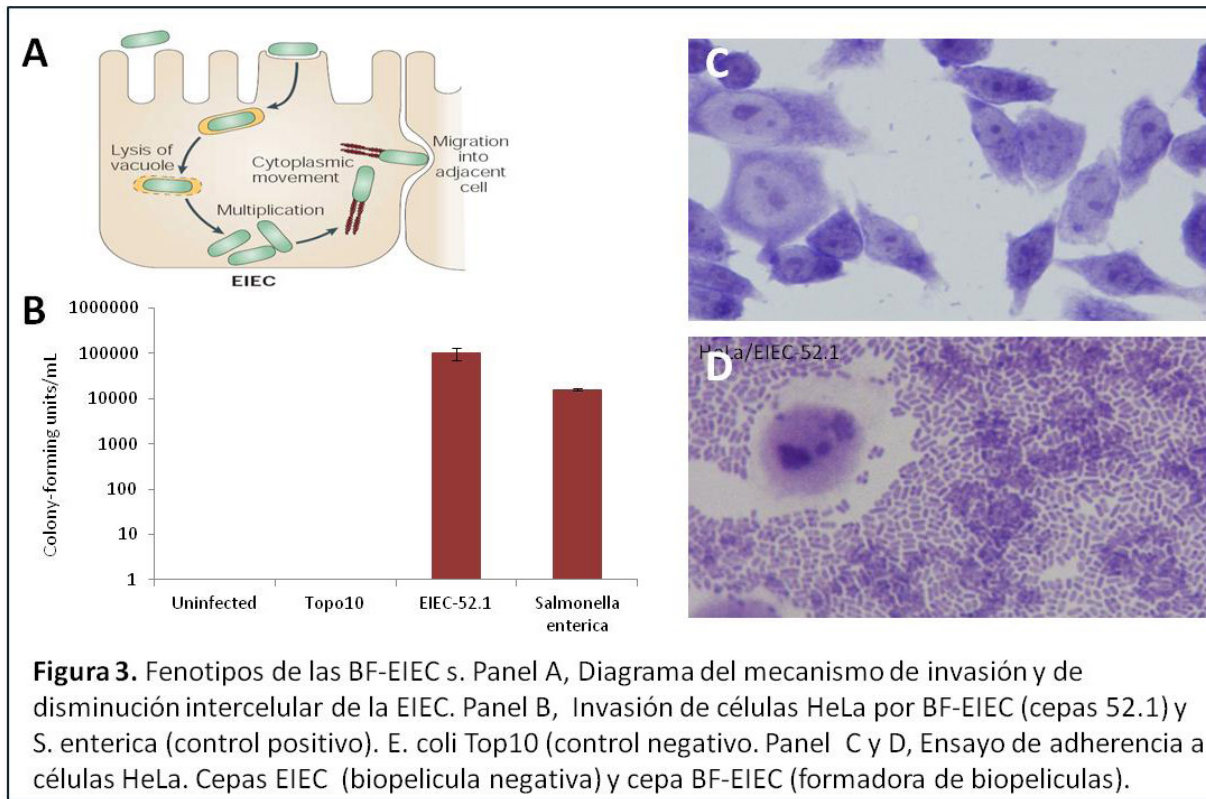


Figura 2. Proporción de agentes diarreagénicos detectados en materia fecal de niños menores de 5 años con o sin diarrea en Bucaramanga, Colombia.



CARACTERIZACIÓN DEL PATOTIPO BF-EIEC EMERGENTE BASADOS EN ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Cepas de EIEC formadoras de biopelículas (BF-EIEC por sus siglas en inglés) fueron aisladas de niños menores de 5 años con diarrea moderada o severa en Colombia. Estas cepas de serotipo O96:H19 no son comunes. Este serotipo no se había aislado anteriormente de casos humanos de infección intestinal o extraintestinal. Con base en técnicas de biología molecular esta cepa fue identificada como EIEC por ser positiva para los genes *ipaH*, *ipaD*, *mixH*, *mixD*, genes que codifican proteínas necesarias para la formación del sistema de secreción tipo III (T₃SS). Este sistema es de vital importancia para que la bacteria invada a las células intestinales.

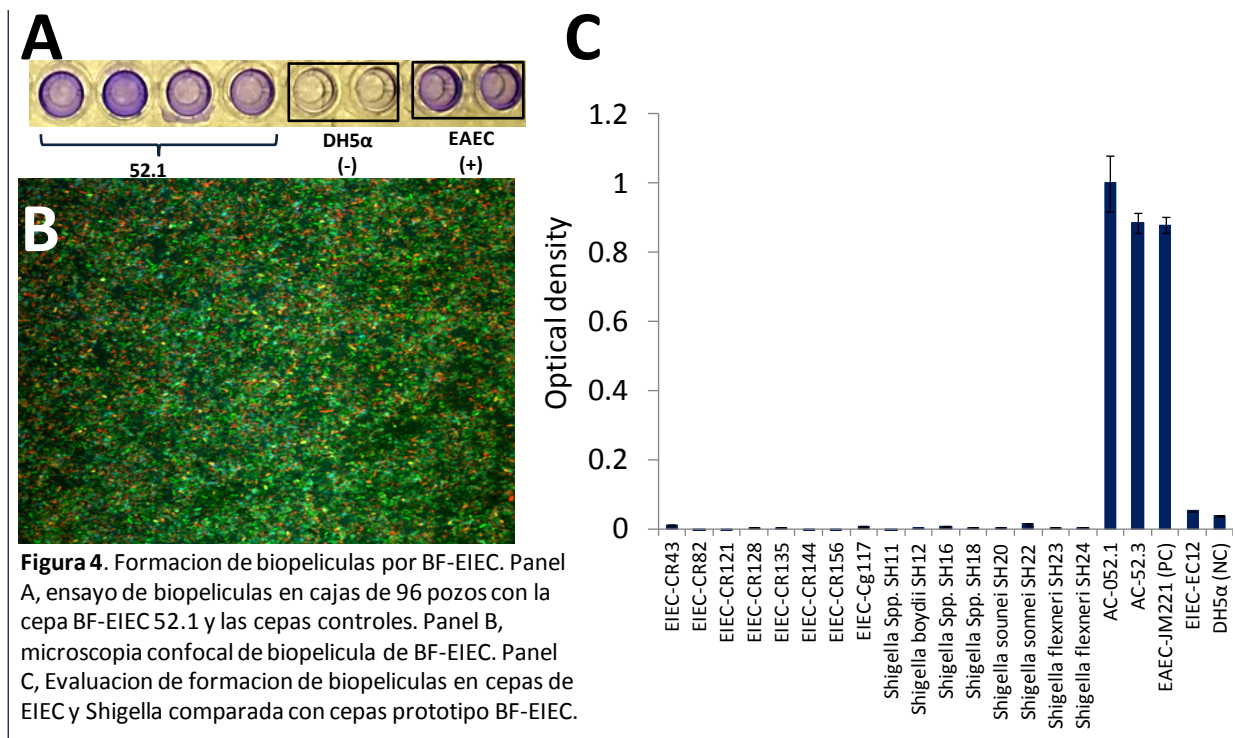
El proceso de invasión requiere que proteínas efectoras se secreten a través del T₃SS al citoplasma de las células epiteliales las cuales inducirán polimerización de actina que resultará en la formación de pseudópodos alrededor de la bacteria induciendo su internalización. Una vez dentro del citoplasma celular la bacteria produce IcsA a nivel de membrana externa y la cual se concentra en un polo bacteriano. La proteína IcsA induce polimerización de actina localmente lo que resulta en un fenómeno de propulsión bacteriana hacia adelante que eventualmente le permitirá a la bacteria diseminarse de célula a célula.

Para evaluar la capacidad de la cepa prototipo BF-EIEC 52.1 de invadir células se procedió a evaluar invasión en un ensayo de infección de células HeLa con gentamicina, en el cual células HeLa se infectan

Tópicos selectos de biomedicina

con bacterias no invasoras (*E. coli* Top10, control negativo), bacterias invasoras (*Salmonella typhimurium*, control positivo) y la cepa prototipo BF-EIEC 52.1. Como puede verse en la Figura 3, la cepa prototipo invade las células HeLa al mismo nivel que la cepa de Salmonella, mientras que la cepa Top10 no tiene capacidad de invasión. Para evaluar adherencia de BF-EIEC a células se infectaron células HeLa con la cepa BF-EIEC 52.1 y con una cepa EIEC control y se incubaron por 1h. Las células infectadas se tiñeron con Giemsa y se examinaron bajo un microscopio de luz. Sorprendentemente la cepa BF-EIEC 52.1 se adhirió en ávidamente no solo a la superficie de las células HeLa pero también al vidrio (Figura 3). La cepa EIEC control, en cambio no tenía una adherencia celular significativa. Teniendo en cuenta la gran avidez de la BF-EIEC 52.1 por unión a las células y al vidrio se procedió a evaluar el papel de esta cepa en formación de biopelículas mediante dos ensayos independientes, el ensayo de biopelículas en caja de 96 pozos y el ensayo de biopelículas mediante microscopia confocal (Figura 4). Se encontró que la BF-EIEC 52.1 tenía la capacidad de formar biopelículas similares al patotipo EAEC. Bajo microscopia confocal la BF-EIEC 52.1 forma un biopelícula gruesa que se tiñe de con calcoflúor indicando que la matriz de la biopelícula tiene un alto contenido en carbohidratos (Figure 4).

Se demostró que la cepa BF-EIEC requería de glucosa para formación de biopelículas. Por el contrario, altas concentraciones de zinc bloqueaban la formación de biopelículas. Estudios de microscopia confocal demuestran que la biopelícula formada por de cepa BF-EIEC esta predominantemente constituida por bacterias vivas y contienen altas concentraciones de polisacáridos. Para evaluar los genes necesarios implicados en la formación de biopelículas y en patogenicidad, la cepa BF-EIEC fue sometida a mutaciones por transposones Tn5-km. Este transposon se inserta al azar en el genoma bacteriano y transfiere un marcador de resistencia a la kanamicina. Un total de 10,000 mutantes Tn5-km fueron evaluados para formación de biopelículas en el ensayo de 96 pozos. En total se obtuvieron 104 cepas mutantes resistentes a kanamicina que eran negativas para formación de biopelículas. Se encontraron mutaciones en el operon *pgc*, también se identificaron mutaciones en otros genes. Para identificar el gen o los genes afectados por el transposon y determinar aquellos implicados en la formación de biopelículas se amplificaron regiones continuas al transposon utilizando una combinación de oligonucleótidos específicos al ADN del transposon y oligos inespecíficos. Fragmentos amplificados fueron secuenciados y las secuencias de ADN obtenidas se analizaron utilizando el software BLAST en línea del NCBI. Los primeros genes identificados fueron genes asociados a la síntesis de polisacáridos, específicamente lo genes *pgaA*, *pgaB*, y *pgaC* (Figure 5). El gen *pgaC* codifica la enzima beta-glicosil-transferasa que facilita la formación de un enlace beta1-6 entre dos moléculas de N-acetil-D-glucosamina.



Para comprobar que la mutante en el gen *pgaC*, incapaz de formar biopelículas, tenía afectada la capacidad de formar polisacárido, se estudiaron la cepa silvestre y la mutante por microscopia confocal. Como puede observarse en las electromicrografías (Figura 5), la cepa BF-EIEC silvestre muestra un material asociado a las bacterias que conecta bacterias entre sí. Por el contrario la cepa BF-EIEC *dpgaC*, carece del dicho material extracelular y las bacterias se observan independientes las unas de las otras. La microscopia confocal igualmente demuestra que la cepa silvestre BF-EIEC forma una abundante biopelícula, que se tiñe de azul con calcofluor lo que demuestra su alto contenido en polisacáridos.

ESTUDIOS GENÓMICOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA BF-EIEC

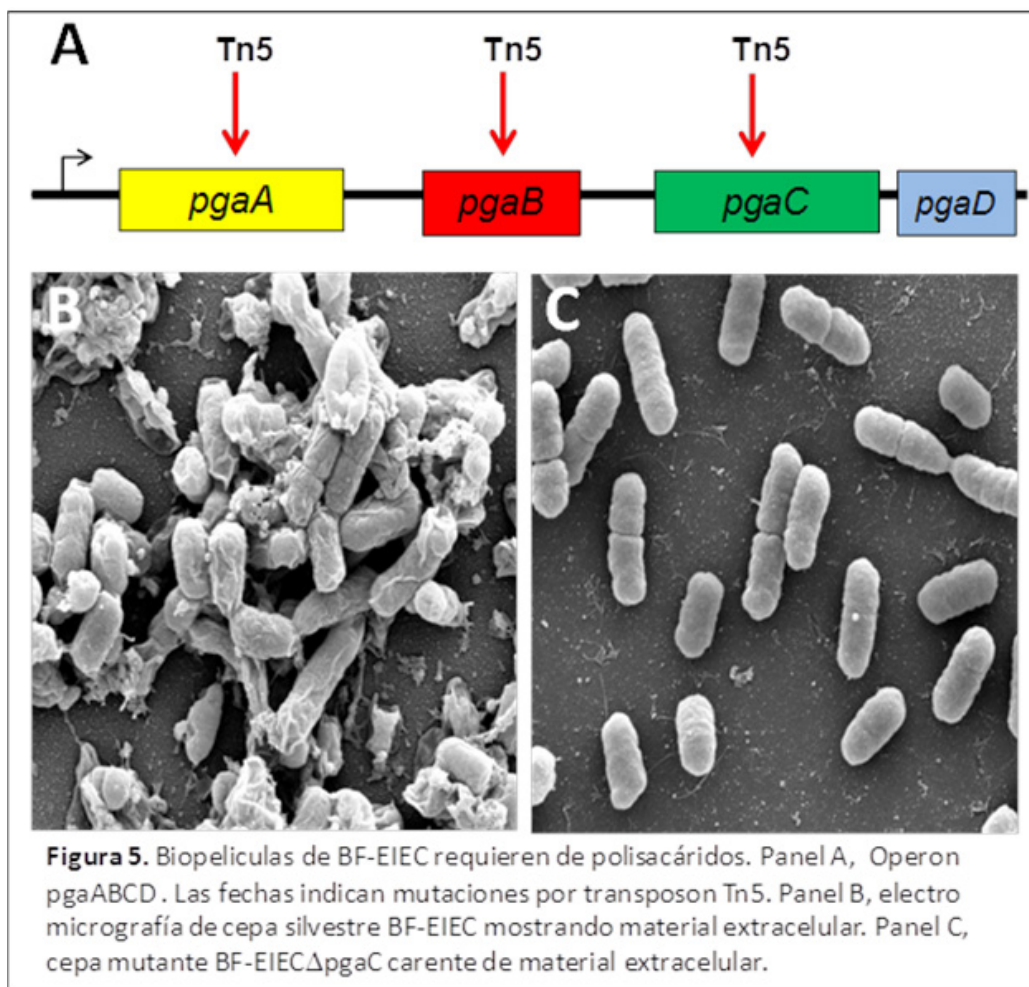
La cepa silvestre BF-EIEC se le aisló ADN genómico para su secuenciación. El ADN genómico fue inicialmente sonificado para obtener fragmentos al azar. Secuencias adaptadoras se ligaron a las regiones 3' de los fragmentos de ADN para luego amplificar los fragmentos por PCR. Fragmentos de PCR fueron purificados para crear la biblioteca genética. Dicha biblioteca fue sometida a secuenciación de ADN utilizando la plataforma de secuenciación HiSeq 2000. Con base en el ensamblaje de las secuencias obtenidas, se mostró que el tamaño del genoma era de ~5.2 Mbp, con un total de 5,320 genes, y un número de secuencias repetidas de 119. El número de ADN minisatelital fue de 68.

El análisis bioinformático del genoma incluyó el análisis del contenido de la secuencia, específicamente la determinación de ADN asociado a genes, número de genes, regiones repetidas, y ARN no-codificante. Para determinar la función de los genes secuenciados y para facilitar su anotación en bases

Tópicos selectos de biomedicina

de datos públicas se utilizó un software llamado Gene Ontology el cual reconoce con base en la secuencia de los genes su función en la estructura celular, función molecular, y en procesos biológicos (Figure 6). El mapa completo del genoma fue posible a través del software BRIG que permite el la creación de mapas circulares y la comparación de un alto número de genomas a la vez. Utilizando este software fue posible no solo obtener el mapa circular del genoma de la cepa BF-EIEC sino también comparar su genoma con genomas de *E. coli* patógenas y *Shigella*.

Con base en dicha comparación se observa que los genomas son muy similares entre cada cepa y que solo diferencias puntuales existen entre las cepas. Dichas diferencias corresponden a islas de patogenicidad, ADN episomal, otros elementos aún por determinar. El análisis filogenético para visualizar asociaciones del de BF-EIEC son otras cepas de *E. coli* se llevó a cabo utilizando cepas de STEC, EAEC-STEC (Cepa de brote Alemán en el 2011), EIEC, *Shigella*, *E. coli* K12. Para crear el árbol filogenético se compararon SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) dentro de regiones codificadoras. Con base en este mapa se puede observar que la cepa BF-EIEC está en el mismo clase de un cepa *Shigella* (Figura 7).



Infectología molecular

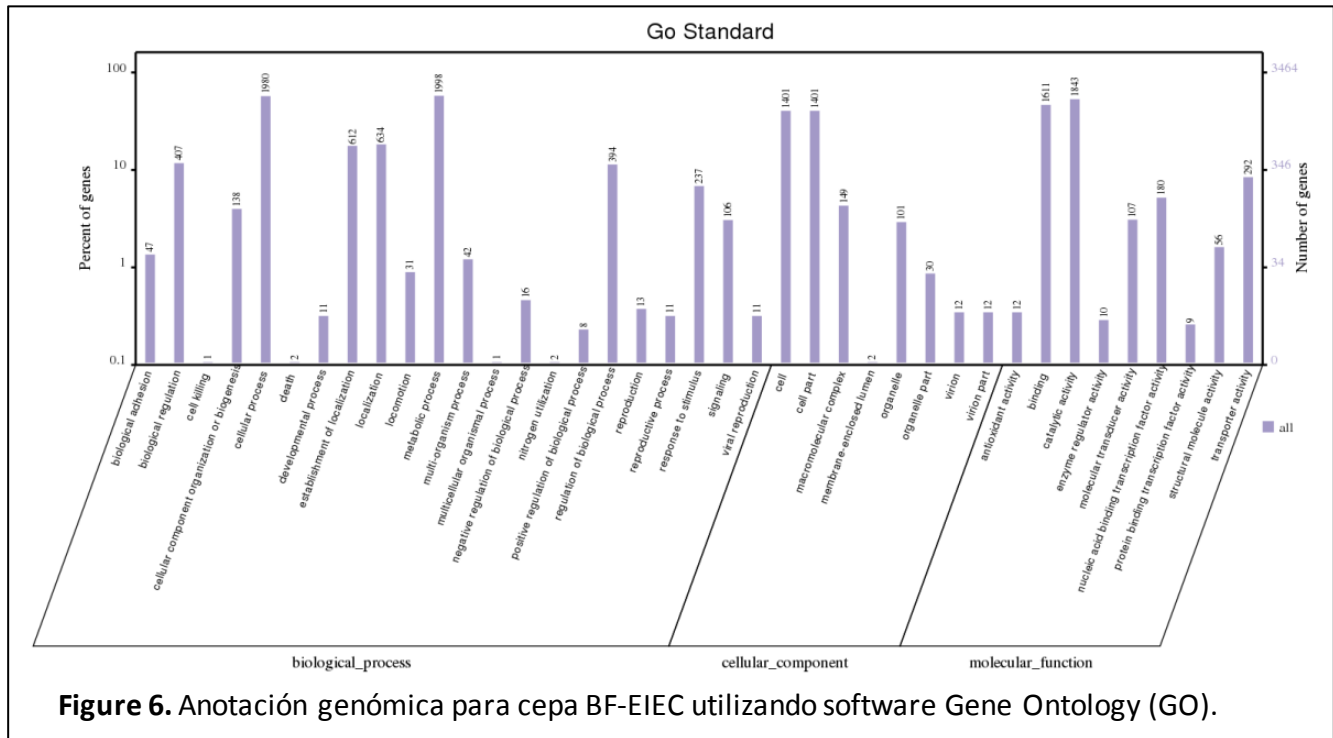
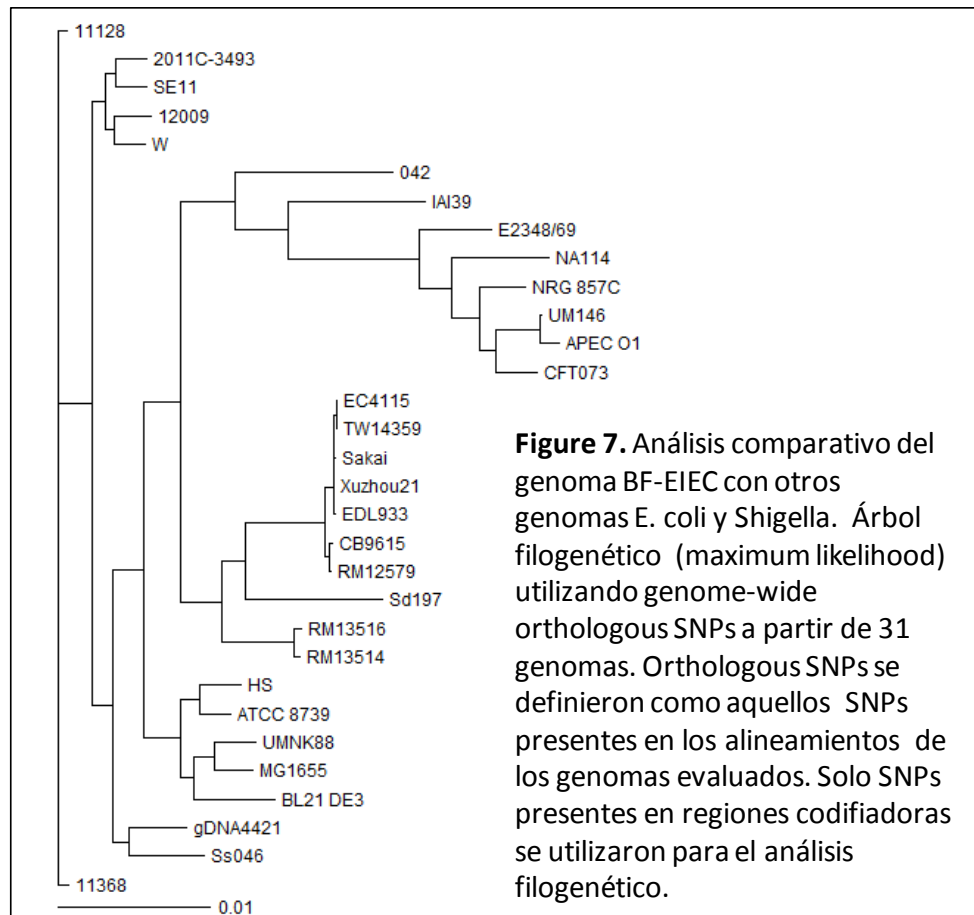


Figure 6. Anotación genómica para cepa BF-EIEC utilizando software Gene Ontology (GO).

CONCLUSIONES

En conclusión, las cepas de *E. coli* patógenas son las cepas que más frecuentemente se aíslan de niños con diarrea en Colombia y otros países de Latino América. Dentro de estas cepas hay patotipos emergentes que consisten en patotipos clásicos con nuevos fenotipos o cepas que poseen genes de virulencia de más de un patotipo clásico. Los estudios genéticos y genómicos han permitido identificar los elementos episomales que al transferirse horizontalmente entre bacterias permiten la generación de agentes patógenos emergentes.

Tópicos selectos de biomedicina



REFERENCIAS

- 1 Brockerhoff M, Hewett P. Inequality of child mortality among ethnic groups in sub-Saharan Africa. *Bull World Health Organ* 2000; 78: 30–41.
- 2 Grimwood K, Forbes DA. Acute and persistent diarrhea. *Pediatr Clin North Am* 2009; 56: 1343–61.
- 3 Halpenny CM, Koski KG, Valdés VE, Scott ME. Prediction of child health by household density and asset-based indices in impoverished indigenous villages in rural Panamá. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86: 280–91.
- 4 Montenegro RA, Stephens C. Indigenous health in Latin America and the Caribbean. *Lancet* 2006; 367: 1859–69.
- 5 Black RE, Cousens S, Johnson HL, *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 2010; 375: 1969–87.
- 6 Thapar N, Sanderson IR. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. *Lancet* 2004; 363: 641–53.

- 7 Huilan S, Zhen LG, Mathan MM, *et al.* Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bull World Health Organ* 1991; 69: 549–55.
- 8 Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 123–40.
- 9 Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, *et al.* Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 93–8.
- 10 Gómez-Duarte OG, Bai J, Newell E. Detection of *Escherichia coli*, Salmonella spp., Shigella spp., Yersinia enterocolitica, Vibrio cholerae, and Campylobacter spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63: 1–9.
- 11 Stacy-Phipps S, Mecca JJ, Weiss JB. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1054–9.
- 12 Vidal M, Kruger E, Durán C, *et al.* Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5362–5.
- 13 Gomez-Duarte OG. Rapid diagnostics for diarrhoeal disease surveillance in less developed countries. *Clin Lab Int* 2009; 33: 7–10.
- 14 Qadri F, Svennerholm A-M, Faruque ASG, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 465–83.
- 15 Hill DR, Beeching NJ. Travelers' diarrhea. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23: 481–7.
- 16 Isidean SD, Riddle MS, Savarino SJ, Porter CK. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *Vaccine* 2011; 29: 6167–78.
- 17 Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KRS, *et al.* Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3396–9.
- 18 Fagundes Neto U, Ferreira V de C, Patricio FR, Mostaçõ VL, Trabulsi LR. Protracted diarrhea: the importance of the enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains and Salmonella in its genesis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; 8: 207–11.
- 19 Levine MM, Edelman R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* 1984; 6: 31–51.
- 20 Ochoa TJ, Contreras CA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24: 478–83.
- 21 McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 1664–8.
- 22 Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 7839–43.
- 23 Girón JA, Ho AS, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1991; 254: 710–3.

Tópicos selectos de biomedicina

- 24 Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1073–86.
- 25 Melton-Celsa A, Mohawk K, Teel L, O'Brien A. Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012; 357: 67–103.
- 26 Johannes L, Römer W. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 105–16.
- 27 Zoja C, Buelli S, Morigi M. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr Nephrol Berl Ger* 2010; 25: 2231–40.
- 28 Taylor DN, Echeverria P, Sethabutr O, et al. Clinical and microbiologic features of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1362–6.
- 29 Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 254: 12–8.
- 30 Okeke IN, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 304–13.
- 31 Lopes LM, Fabbrocotti SH, Ferreira AJP, Kato MAMF, Michalski J, Scaletsky ICA. Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1968–72.
- 32 Le Bouguéne C, Servin AL. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 256: 185–94.
- 33 Buchholz U, Bernard H, Werber D, et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med* 2011; 365: 1763–70.
- 34 Ruggenti P, Remuzzi G. A German outbreak of haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 2011; 378: 1057–8.
- 35 Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol* 2011; published online June 29. DOI:10.1007/s00203-011-0725-6.
- 36 Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med* 2011; 365: 709–17.

Tópicos selectos de biomedicina

La resistencia a antimicrobianos en la era genómica

BÁEZ-FLORES MARÍA ELENA¹ HERNÁNDEZ-PEINADO JESSICA VICTORIA¹, GÓMEZ-GIL BRUNO²,
DE LA CRUZ OTERO MARÍA DEL CARMEN, ENCISO-IBARRA JULISA², Y PACHECO-ARJONA RAMÓN

¹Unidad de Investigaciones en Salud Pública «Dra. Kaethe Willms»,
Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa,

²Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo AC, Unidad Mazatlán

Por más de 60 años los antibióticos se han considerado la panacea para la cura de infecciones. Sin embargo, al desarrollo de cada nuevo antibiótico, le ha seguido la detección de resistencia a éste (OMS, 2014). El desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo normal que se ha acelerado por la presión selectiva ejercida por el extensivo uso de los antibióticos (OMS, 2014). La resistencia a antimicrobianos eleva las tasas de morbilidad y mortalidad (Donkor et al. 2013) debido a que prolonga las enfermedades.

Este es un problema a escala global que podría poner a la humanidad en una situación similar a la de la era preantibiótica, por la pérdida de eficacia de los antibacterianos (OMS, 2014). En Estados Unidos alrededor de 2,000,000 de personas se infectan anualmente con microorganismos resistentes, lo que ha originado la iniciativa de Resistencia a Antibióticos en ese país. Además, junto con la Comisión Europea ha creado el programa Fuerza de Tarea Transatlántica (TATFFAR) que busca enfrentar la resistencia a antibióticos (ECDC, 2013). Otras organizaciones internacionales creadas para vigilar la resistencia en los patógenos son: ANSORP (Asian Network Surveillance of Resistance Pathogens) en la Región Asia-Pacífico; CAESAR (Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance); RusNET (Red de la Federación Rusa para el Monitoreo de la Resistencia a Antimicrobianos); ARMed (Antibiotic Resistance Surveillance and Control in the Mediterranean Region: Chipre, Egipto, Jordania, Malta, Marruecos, Tunisia y Turquía); EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network); BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) en Reino Unido e Irlanda; Red Internacional de 32 Institutos del Instituto Pasteur, CHARLI (Children's Antibiotic Resistant Infections in Low-Income countries); ReLAVRA (Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos OMS/OPS) y SIREVA (Sistema de Redes de Vigilancia de Agentes Responsables de Neumonías y Meningitis Bacterianas).

Por su parte, la OMS ha solicitado a sus países miembros datos recientes sobre epidemiología y resistencia a antibióticos de los llamados "Patógenos Centinela", entre los cuales se encuentran *Mycobacterium tuberculosis* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos y cefalosporinas; *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas y flouroquinolonas; *Shigella* resistente a flouroquinolonas; *Neisseria gonorrhoeae* resistente a cefalosporinas y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (OMS, 2014). Como respuesta a esa solicitud, sólo 114 países miembros enviaron información sobre alguna de las bacterias en cuestión, pero su presencia mundial es evidente (OMS 2014). Para efecto de la vigilancia de la resistencia a antibióticos, la OMS ha establecido seis regiones geográficas: la región Africana, la de las Américas, la

Mediateránea Oriental, la Europea, la región Sureste de Asia y la región del Pacífico Occidental. En su informe anual 2014, la OMS reportó 50% o más, de aislados de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación en cinco de las seis regiones de esta organización; igualmente reportó arriba del 50% de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a estos antibióticos en las seis regiones de la OMS. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos, usualmente el último recurso para tratamiento, está reportada en la proporción mencionada en dos de las regiones de la OMS. La resistencia de *S. aureus* a meticilina está reportada en la misma proporción en cinco de las seis regiones; mientras que la resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina está reportada en el 25% de los aislados o más, en todas las regiones de la OMS. Además, la resistencia de *Salmonella* y *Shigella* a fluoroquinolonas están reportadas en el 25% de los aislados en tres y seis regiones de la OMS, respectivamente.

Por otra parte, la BBC en Inglaterra lanzó la competencia Longitude 2014 para determinar por votación de la comunidad internacional el asunto más preocupante para la sociedad global. El tema ganador fue la resistencia a antimicrobianos, dejando de lado temas tan importantes como seguridad alimentaria, escases de agua, cambio climático, parálisis y demencia. Esta iniciativa busca en un plazo de cinco años, el desarrollo de un método rápido y eficaz para determinar el agente causal de infección y el antimicrobiano correcto contra dicho patógeno. Esto con el fin de cambiar la forma en que se prescriben y utilizan los antibióticos, así como para minimizar la diseminación de la resistencia de los microorganismos.

Actualmente, nos encontramos ante la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia cuyo origen es la plasticidad del genoma (Rossolini y Thaller, 2010). El genoma bacteriano a pesar de su pequeño tamaño es muy dinámico y sufre eventos de variación genética como mutaciones, duplicaciones, inversiones, transposiciones, recombinaciones, inserciones y deleciones (Donkor et al. 2013), que permiten a las bacterias adquirir genes para desarrollar resistencia. La investigación a escala genómica brinda información para entender dichos mecanismos. La disponibilidad de secuencias genómicas está revolucionando los campos de la bacteriología y las enfermedades infecciosas. Desde 1995, año en que se publicaron los dos primeros genomas de bacterias patógenas para el hombre (*Haemophilus influenzae* y *Mycoplasma genitalium*), se han secuenciado completamente 4274 genomas procariotas y la lista crece aceleradamente gracias al impulso de las nuevas tecnologías de secuenciación. A la fecha están registrados un total de 48588 proyectos de secuenciación de genomas procariotas en NCBI. Las bacterias con más genomas secuenciados son *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

La enorme cantidad de datos genómicos que se han generado han conducido a avances sin precedentes en el diagnóstico de patógenos, genotipificación, detección de virulencia y especialmente en la predicción de resistencia a antibióticos.

ASPECTOS INTERESANTES DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS REVELADOS POR LA SECUENCIACIÓN DE GENOMAS

La secuenciación de genomas bacterianos ha desnudado base por base el contenido genómico de las bacterias en condiciones particulares; ha producido hallazgos que hace unos años eran impensables, como detectar el orden de aparición de las mutaciones en el genoma, cuando está respondiendo a la presión selectiva impuesta por la presencia de uno o más antibióticos. Esto tiene implicaciones muy importantes

Asimismo, tras la breve terapia con rifampicina, entre JH1 y JH2 se observó un incremento de más de 1000 veces en el MIC para rifampicina pasando de 0.012 µg/mL en JH1, a 16 µg/mL en JH2; esto se relacionó con la aparición de las mutaciones 3-6. Entre los aislados JH2 y JH5 se registró un incremento en el MIC de vancomicina de 4 a 6 µg/mL que se relacionó con la mutación en SA1249 (de función desconocida). Entre los aislados JH5 y JH6 se registró un incremento en el MIC de vancomicina de 6 a 8 µg/mL que se asoció con las mutaciones 10-18 (*agr*, *yycH*). Entre los aislados JH6 y JH9 se mantuvo el MIC de vancomicina de 8 µg/mL, pero su fenotipo se relacionó con las mutaciones 2 a 8 y 10 a 18. Los aislados resistentes a vancomicina mostraron además, un decremento en la susceptibilidad a daptomicina, a pesar de que este antibiótico no se había usado en el tratamiento. El MIC de daptomicina pasó de 0.1 µg/mL en JH1 a 0.5 µg/mL en JH2 y JH5 y, 1.0 µg/mL en JH6 y JH9.

Uno de los *locus* mutados asociado con el decremento de la susceptibilidad a vancomicina, el operon *vraR*, también se encontró con mutaciones en seis aislados resistentes a vancomicina provenientes de diferentes regiones geográficas (Mgwangi et al., 2007). Asimismo, muchos aislados de *S. aureus* de origen geográfico diverso resistentes a vancomicina presentan mutaciones causantes de pérdida de función en el *locus agr*, involucrado en el proceso “quorum sensing” (Mwangi et al. 2007). Otro hallazgo de esta investigación fue que a pesar de que sólo se habían detectado 35 mutaciones, mediante un estudio transcriptómico se encontraron 244 genes diferencialmente expresados (a un nivel de expresión del doble o más) entre los aislados. Esto confirma que un número limitado de mutaciones puede producir cambios extensivos en el perfil de expresión genética.

LA EVOLUCIÓN DE GENOMAS BACTERIANOS DURANTE LA INFECCIÓN. OTRAS APORTACIONES DE LA ERA GENÓMICA

La secuenciación de genomas bacterianos también provee la oportunidad de estudiar la evolución del genoma bacteriano durante la infección. Existen estudios genómicos que han revelado patrones de diversificación genética que ofrecen un panorama de las bases genéticas de la adaptación durante la infección crónica (Price et al., 2012). En un estudio realizado en *Helicobacter pylori*, (Kennemann et al. 2011) secuenciaron cepas de esta bacteria obtenidas sucesivamente a partir de pacientes infectados crónicamente, desde 3 hasta 16 años y un voluntario experimentalmente infectado. Como resultado, los genomas de las cepas de los pacientes con 3 a 4 años de infección presentaron una frecuencia de recombinación significativa en los genes codificantes de proteínas de membrana externa. Además, la frecuencia de recombinación de estos genes se incrementó hasta en un 65% en las cepas de pacientes con 16 años de infección. En contraste, no se observó evidencia de recombinación en las cepas del voluntario recién infectado experimentalmente. Los autores de este trabajo concluyeron que el genoma de *H. pylori* acumula mutaciones y recombinaciones en caso de infección crónica con varias cepas de la misma bacteria (Kennemanet al. 2011).

En otro trabajo, Oh et al. (2006) secuenciaron genomas de *H. pylori* de un paciente con gastritis crónica atípica antes de la progresión a adenocarcinoma gástrico y también cuatro años después, cuando se estableció el diagnóstico de cáncer gástrico. Estos autores encontraron que en la progresión a cáncer gástrico se habían ganado 9 genes (que no se detectaron en los genomas de las cepas recobradas en la etapa de la gastritis crónica atípica) y se habían perdido 6 genes. Entre los genes perdidos en las cepas de la etapa

Tópicos selectos de biomedicina

de cáncer estaban los genes relacionados con la reparación del DNA. La pérdida de estos genes sugiere una mayor propensión de las bacterias a la inestabilidad genómica. Otros estudios ya han demostrado que la inestabilidad genómica es una estrategia para evadir la respuesta inmune del hospedero y lograr la persistencia de la infección.

LOS GENOMAS Y LA GEOGRAFÍA; RASTREO DE TRANSMISIÓN DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS E INTERCONTINENTALES

La superioridad de la genómica sobre los métodos tradicionales es innegable. Mediante la tipificación tradicional no se ha podido subtipificar a *S. aureus* ST-239, un linaje de HA-MRSA (hospital-acquired MRSA) dominante en gran parte de Asia que es multirresistente a fármacos (Wilson et al. 2012). Sin embargo, la secuenciación descubrió 4310 SNPs (single nucleotide polymorphisms) en el genoma núcleo, revelando una detallada estructura geográfica del linaje (Harris et al. 2010). Se han descrito variantes de la clona epidémica ST239 en China, Tailandia, Turquía, Europa y Sudamérica (Brasil, Chile, Argentina y Uruguay). En un análisis comparativo entre 63 genomas provenientes de dos muestras distintas (43 genomas de *S. aureus* de una colección internacional y 20 genomas de aislados de un hospital tailandés) (Harris et al. 2010), los autores encontraron polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) principalmente en genes involucrados en resistencia a antibióticos; diez polimorfismos correspondieron a mutaciones conocidas específicamente por conferir resistencia.

En el caso de los 20 genomas del hospital tailandés, éstos resultaron sumamente divergentes al compararlos con el clado sudamericano; de los 20 aislados, cinco se diferenciaron sólo por 14 SNPs. Cuatro de estos aislados habían sido obtenidos en un período de 16 días y el quinto, 11 semanas después. Los autores observaron que esos cinco aislados se habían obtenido en salas de bloques adyacentes del hospital; asimismo notaron que esas salas no estaban representadas en el grupo de los aislados más divergentes (Harris et al. 2010). Esto demuestra la utilidad de la secuenciación en el estudio y rastreo de la transmisión de infecciones intrahospitalarias. Por otra parte, la secuenciación permite distinguir cepas que son genéticamente indistinguibles utilizando los métodos convencionales; evidencia de esto es un estudio en Inglaterra en el que se pudo discriminar entre cepas MRSA causantes de un brote en un hospital y cepas no relacionadas con el brote (Koser et al. 2012).

Además, el análisis filogenético de las dos colecciones de genomas, mostró una notable consistencia con la fuente geográfica del aislado. Los aislados sudamericanos, con una excepción, se agruparon estrechamente en un clado muy diferente y uniforme. De manera similar los aislados chinos y tailandeses formaron un único, aunque más diverso, clado Asiático. Adicionalmente, el estudio incluyó dos clones ST239 que predominaban en hospitales portugueses en los 90's (el clon Portugués y el clon Brasileño). Todos los aislados del clon portugués se agruparon juntos, mientras que el clon brasileño se agrupó con los aislados sudamericanos.

Contra este fondo de diferenciación geográfica mediante secuenciación, hay casos de transmisión intercontinental que se ha rastreado gracias también a la secuenciación. Por ejemplo, el agrupamiento de dos aislados europeos (uno de Inglaterra y otro de Dinamarca) dentro del grupo Tailandés (Harris et al.

2010) evidenció la ocurrencia de transmisión entre continentes. Además de los polimorfismos del genoma núcleo, ambos aislados contenían un profago característico del clado Asiático.

OTRAS APORTACIONES DE LA SECUENCIACIÓN DE GENOMAS BACTERIANOS

Como se mencionó anteriormente, una aplicación sobresaliente de la secuenciación, es la búsqueda de determinantes de virulencia conocidos mediante la «interrogación in silico» de los genoma y que se utiliza como una alternativa a los métodos basados en PCR convencional (Price et al., 2012). Cabe mencionar que no solamente se pueden detectar factores de virulencia conocidos; la secuenciación y anotación de los dos primeros genomas completos de *S. aureus* resultó en el descubrimiento de 70 nuevos factores de virulencia. Otra secuenciación encontró 19 factores de virulencia adicionales (Price et al., 2012).

Por otra parte, con datos de secuenciación de aislados seriales de portadores se ha establecido que la tasa de mutación de *S. aureus* una mutación por sitio (SNP) en el genoma núcleo aproximadamente cada 6 semanas. Por lo tanto, los polimorfismos de un solo nucleótido pueden usarse como un reloj molecular para medir el tiempo que ha transcurrido desde que dos aislados compartieron un ancestro común y hacer inferencias sobre las transmisiones recientes (Harris et al. 2010).

Con todo lo anteriormente expuesto, una aplicación lógica es el uso de datos de secuenciación en la predicción de la resistencia a antimicrobianos. En 2014 se publicó un estudio que demostró la sensibilidad de la secuenciación en la predicción de la resistencia a antibióticos (Gordon et al. 2014). Los autores analizaron genomas de *S. aureus* buscando un panel de determinantes de resistencia conocidos (genes cromosómicos y plasmídicos) para predecir a qué antibióticos eran resistentes las cepas. Los resultados de los estudios genómicos se compararon con la susceptibilidad fenotípica de las cepas frente a 12 antibióticos de uso común. Las pruebas de susceptibilidad se hicieron tanto por el método de difusión en disco, como por la técnica de dilución en caldo. En la validación de la sensibilidad y especificidad del método de predicción genómica, se encontró que el método genómico resultó tan sensible y específico, como las pruebas de susceptibilidad a antibióticos de rutina. Esto convierte a la secuenciación en una alternativa a los métodos de cultivo para la predicción de resistencia en bacterias y otros organismos.

¿QUÉ SE ESTÁ HACIENDO EN MÉXICO?

En un trabajo previo realizado en la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms” de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, con niños de tres estancias infantiles, se encontró una prevalencia de *S. aureus* de 42%. *Staphylococcus aureus* es un patógeno primario que puede causar una amplia variedad de infecciones que incluyen lesiones superficiales, infecciones que ponen en riesgo la vida (endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y bacteriemia) y enfermedades producidas por toxinas (intoxicación alimentaria, y los síndromes de piel escaldada y shock tóxico). Este microorganismo es un patógeno ubicuo con elevadas tasas de morbi-mortalidad en todo el mundo (OMS, 2014) que ha demostrado un gran poder de adaptación a los agentes antimicrobianos (Nabón, 2006). Debido a su resistencia a la penicilina se introdujeron al

Tópicos selectos de biomedicina

mercado cefalosporinas estables a penicilinasas y penicilinas semi sintéticas como la metilina que se convirtió en el antibiótico de elección en el tratamiento de infecciones por *S. aureus*. Sin embargo, un año después de su introducción en 1959, se detectó la primera cepa resistente a metilina (Gil, 2000). Desde entonces, *S. aureus* resistente a la metilina (MRSA, Methicillin Resistant, *Staphylococcus aureus*) se ha considerado uno de los principales patógenos nosocomiales en todo el mundo. Cabe señalar, que en las dos últimas décadas se ha presentado la emergencia y diseminación de cepas resistente a la metilina asociados a la comunidad (CA-MRSA, Community Associated Methicillin Resistant *S. aureus*) en individuos sin contacto previo con hospitales (Casado-Verrier et al, 2012; OMS 2014). Esto es relevante considerando que las personas infectadas por *S. aureus* MRSA tienen 64% más probabilidad de morir que las infectadas por cepas sensibles (OMS, 2014) y una de las condiciones para sufrir una infección por *S. aureus*, es ser portador de este microorganismo.

A las cepas aisladas de niños de estancias infantiles se les hicieron estudios de sensibilidad a antibióticos y se observó resistencia principalmente a betalactámicos (3-84%, dependiendo el antibiótico), macrólidos (21%), así como a tetraciclinas y sulfonamidas (6%). Además se observó que el 84% de las cepas (64/76) fueron resistentes al menos a un antibiótico; el 77% (59/76) mostró resistencia a 2 antibióticos y el 9% resultó multiresistente (de 5 a 8 antibióticos). Además, 9% de las cepas de *S. aureus* (7/76) resultaron metilino resistentes (MRSA). Estas cepas representan un riesgo de diseminación y emergencia de infecciones de difícil tratamiento para los niños portadores. Algunas poseen el gen *mecA*, codificante de resistencia a metilina y betalactámicos, otras no; sin embargo, son multiresistentes (datos no publicados).

Diversos estudios de tipificación tradicional con más de 3000 cepas MRSA circulantes en diferentes áreas geográficas del mundo y en diferentes periodos, han revelado una estructura clonal conservada entre ellas y se han identificado seis clonas con capacidad de diseminación global denominadas clonas MRSA pandémicas: ibérica, brasileña, pediátrica, húngara, New York/Japón y EMRSA-16 (Aires de Sousa y Lencastre, 2004). Las determinaciones más recientes de clonas MRSA pandémicas se han efectuado en América Latina, donde predomina la clona Brasileña. Sin embargo, Velazquez-Meza et al. (2004) reportaron la introducción de la clona C, perteneciente al linaje de la clona New York/Japón, en un hospital de la Ciudad de México. Por otra parte, algunas clonas MRSA comunitarias también se han diseminado y existen dos que son las principales, la clona USA 300 y USA 400 (Álvarez y Ponce, 2012).

Indudablemente, la necesidad de identificar las clonas resistentes de alto riesgo así como la importancia de entender la evolución de la resistencia justifican el considerable esfuerzo internacional que se está realizando para secuenciar cepas de *S. aureus* resistente a metilina (Rassolini y Thaller 2010). Es importante acotar que un solo genoma de una cepa provee una instantánea del organismo en un punto en el tiempo; ofrece evidencia sobre los “loci” presentes y su función, pero no aporta información sobre la diversidad genética intraespecífica. La única forma de detectar esa variación es secuenciando múltiples genomas. Los datos genómicos revelan la variación en el contenido genético que impacta la resistencia a fármacos y la virulencia (Croucher et al. 2013), entre otros. Los datos experimentales han demostrado que en algunas especies se han descubierto nuevos genes aún después de secuenciar varias cepas. Asimismo el modelaje matemático predice que se descubrirán nuevos genes aún después de secuenciar cientos de genomas por especie (Medini et al. 2005).

Debido a la problemática de la resistencia a antimicrobianos de *S. aureus* a nivel mundial, es imprescindible el estudio a nivel genómico de la resistencia de esta bacteria en diversas regiones del planeta.

Considerando esta necesidad y el hecho de que no se conoce el genoma de ninguna cepa de *S. aureus* mexicana, se decidió secuenciar el genoma de una cepa de *S. aureus* MRSA obtenida de niños sanos en estancias infantiles de Sinaloa con el objetivo de analizar las características genómicas subyacentes al fenotipo de multirresistencia en esta cepa mexicana. En nuestro conocimiento, no se ha secuenciado ninguna cepa de *S. aureus* en nuestro país.

SECUENCIACIÓN DE *S. AUREUS* MRSA MULTIRRESISTENTE OBTENIDO DE NIÑOS APARENTEMENTE SANOS EN ESTANCIAS INFANTILES DE SINALOA

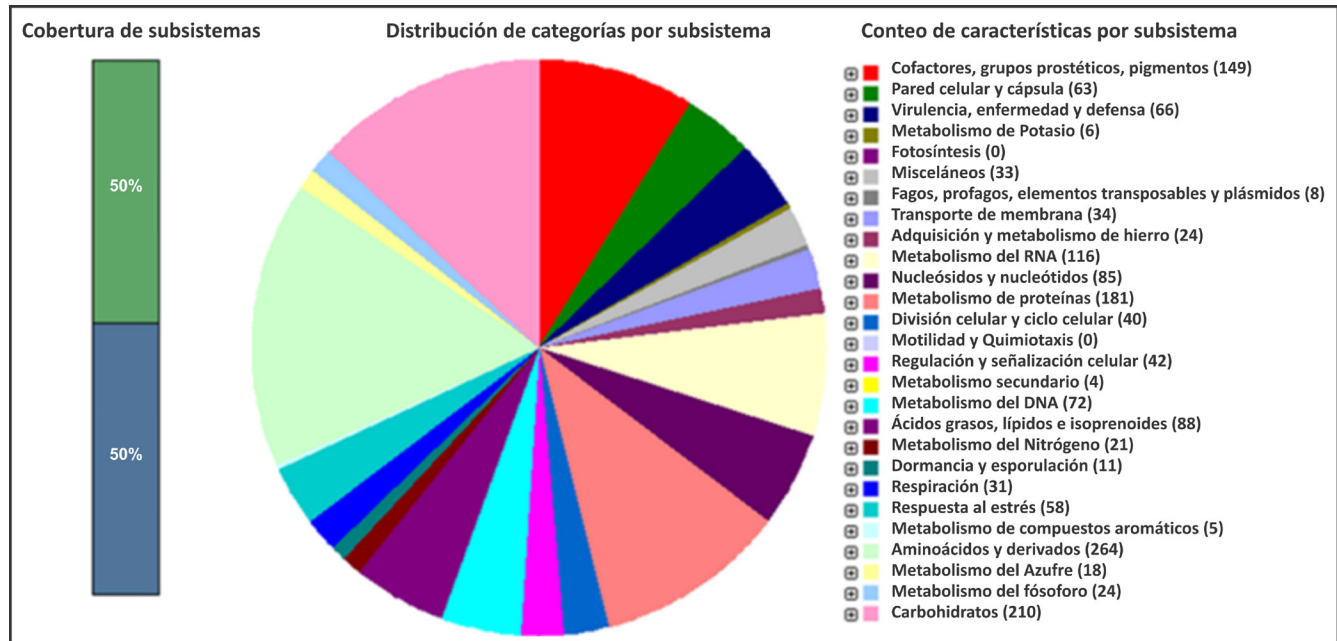
La cepa de *S. aureus* MRSA se obtuvo de un niño que asiste a una estancia infantil en Culiacán Sinaloa. La cepa se identificó mediante tinción Gram y pruebas bioquímicas (catalasa, coagulasa, fermentación de manitol y producción de DNAsa). La identidad se confirmó mediante secuenciación (Macorgen, Seoul, Korea) de la región 16S del DNA ribosomal. Posteriormente se le hicieron pruebas de susceptibilidad a 15 antibióticos (Multidiscos Gram Positivos II, BioRad) por medio de la técnica de difusión en disco según la técnica de Kirby-Bauer bajo las normas del CLSI. La cepa resultó resistente a ampicilina, dicloxacilina, penicilina, oxacilin, cefoxitina con fenotipo MRSA. La presencia del gen *MecA* se confirmó mediante el protocolo de PCR publicado por Acosta-Pérez et al. (2012).

La secuenciación se realizó utilizando la plataforma Ion Torrent (Life Technology) y la genoteca se preparó de acuerdo con el protocolo del kit Ion Express Plus Library. La genoteca se utilizó como plantilla para la amplificación clonal por PCR de emulsión (Ion Xpress Template 200 Kit). La secuenciación se realizó en un chip 318 (Ion Sequencing 200 kit). Una vez obtenida la secuencia del genoma de *Staphylococcus aureus* MRSA 52-2, se realizó la depuración de lecturas mediante el software PrinSeq vo.20.4.; el ensamblaje se hizo con el programa Newbler v2.3 y la anotación se realizó en el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology). El armado en Scaffolds se hizo con el programa MEDUSA v1.6. A partir de los scaffolds obtenidos se realizó un remapeo de las secuencias contra el genoma de referencia (NCTC8325) con el programa MAUVE.

Como resultado del análisis bioinformático se determinó que la secuencia de *S. aureus* MRSA 52-2 tiene 2,267,926 pb con un contenido de GC de 31.86%. Además contiene 2,402 secuencias codificantes (CDS) agrupadas en 363 subsistemas, de los cuales, solo al 50% se le pudo asignar una función bioquímica conocida, mientras que el otro 50%, a pesar de ser secuencias codificantes, no se les asignó alguna función (Fig. 2). Este genoma contiene 57 subtipos de RNAs ribosomales (ARNr).

Tópicos selectos de biomedicina

FIGURA 2. Resultados de la anotación del genoma en el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology)



En los análisis realizados hasta el momento en el genoma de *S. aureus* MRSA se ha confirmado la existencia de secuencias relacionadas con el fenotipo MRSA y resistencia múltiple a antibióticos. Entre estas se encuentran secuencias correspondientes al gen *MecA* (determinante de la resistencia a meticilina), a la proteína FmtA involucrada en la resistencia a meticilina y a la proteína B que confiere resistencia múltiple a drogas. También se encontró una secuencia correspondiente a un sensor-transductor regulador de la familia BlaR1/MecR1 involucrado en resistencia a Beta-lactámicos y una región de 1,356 pb en el “cluster” del subsistema de «puntos de control de chequeo bacteriano» y del metabolismo del ácido siálico, también involucrados en la resistencia a meticilina. Adicionalmente, se encontraron secuencias correspondientes a proteínas de eflujo de macrólidos, proteínas de resistencia a Quinolonas y Acriflavina, así como a permeasas exportadoras de Bacitracina (BceA, BceB). Asimismo, se encontraron ATPasas transportadoras de Plomo, Cadmio, Zinc, Cobre y Mercurio y un regulador transcripcional de la familia MarR involucrado en resistencia múltiple. También se encontraron varios transportadores responsables de la resistencia múltiple a drogas (uno de el flujo de múltiples drogas, uno de la familia MS y otro de la subfamilia EmrB/QacA).

El análisis del genoma continúa; se realizarán estudios de genómica comparativa con cepas secuenciadas en América y otras regiones del mundo. Además, se incluirán cepas sensibles a antibióticos. Las nuevas tecnologías nos ofrecen la oportunidad de indagar como nunca antes en los genomas de los microorganismos. Como descendientes de las primeras formas de vida, los microorganismos tienen los secretos de nuestro pasado y las perspectivas de nuestro futuro ya que estamos buscando en sus genes soluciones para los problemas más grandes del planeta, desde el calentamiento global, hasta la resistencia a antibióticos (Nikos et al 2014).

REFERENCIAS

- Aires de Sousa, M., & Lencastre, H. (2004). Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 40(2), 101-111.
- Álvarez Lam, I., & Ponce Bittar, J. (2012). *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno. *Revista Cubana de Pediatría*, 84(4), 383-391.
- Donkor, E. S. (2013). Sequencing of bacterial genomes: principles and insights into pathogenesis and development of antibiotics. *Genes*, 4(4), 556-572.
- ECDC. 2013. Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades. <http://www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx>
- Gordon, N. C., Price, J. R., Cole, K., Everitt, R., Morgan, M., Finney, J., ... & Golubchik, T. (2014). Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 52(4), 1182-1191.
- Harris, S. R., Feil, E. J., Holden, M. T., Quail, M. A., Nickerson, E. K., Chantratita, N., ... & Bentley, S. D. (2010). Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science*, 327(5964), 469-474.
- Köser, C. U., Holden, M. T., Ellington, M. J., Cartwright, E. J., Brown, N. M., Ogilvy-Stuart, A. L., ... & Peacock, S. J. (2012). Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *New England Journal of Medicine*, 366(24), 2267-2275.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Masignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current opinion in genetics & development*, 15(6), 589-594.
- Mwangi, M. M., Wu, S. W., Zhou, Y., Sieradzki, K., de Lencastre, H., Richardson, P., ... & Tomasz, A. (2007). Tracking the in vivo evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(22), 9451-9456.
- Organización Mundial de la Salud. World Health Organization. 2014. Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. ISBN 9789241564748.
- Price, J., Gordon, N., Crook, D., Llewelyn, M., & Paul, J. (2013). The usefulness of whole genome sequencing in the management of *Staphylococcus aureus* infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), 784-789.
- Rossolini, G. M., & Thaller, M. C. (2010). Coping with antibiotic resistance: contributions from genomics. *Genome Med*, 2(2), 15.
- Velazquez-Meza, M. E., De Sousa, M. A., Echaniz-Aviles, G., Solorzano-Santos, F., Miranda-Novales, G., Silva-Sanchez, J., & De Lencastre, H. (2004). Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3877-3880.
- Wilson, D. J. (2012). Insights from genomics into bacterial pathogen populations. *PLoS Pathog*, 8(9), e100287.

Cross-immunoreactivity among hepatitis C virus hypervariable region 1 variants

GILBERTO VAUGHAN

Division of Viral Hepatitis, Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, GA, USA

ABSTRACT

Background and Objective: The hypervariable region 1 (HVR₁) of hepatitis C virus (HCV) contains neutralizing epitope(s). Although cross-reactivity between HVR₁ variants has been observed, its high degree of amino-acid diversity limits the extent of cross-reactive antibody recognition, making it more difficult to find vaccine candidates. The goal of this study was to evaluate antibody cross-immunoreactivity against different HVR₁ variants in order to identify antigens with a possible application for hepatitis C vaccine development.

Methods: Sequences of HVR₁ variants were inserted at the N-terminus of the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and individually expressed as chimeric virus-like particles (HVR₁-VLPs) in *Hansenula polymorpha*. Balb/c mice were immunized with the purified proteins and their sera were tested individually by an enzyme immunoassay against a panel of HVR₁ synthetic peptides.

Results: All sera showed reactivity to HBsAg, reflecting successful immunization of all mice. Sixteen HVR₁ peptides were not recognized by any sera and were excluded from analysis. Antibodies to HVR₁-HBsAg constructs showed cross-immunoreactivity rates that varied from 0.6% to 49.4% (from 2 to 153 peptides). Binary optimization analyses could identified a set of anti-HVR₁-HBsAg sera immunoreacting with a large number HVR₁ peptides.

Conclusions: Cross-immunoreactivity is not limited to genetically close epitopes and varies in a wide range among HVR₁ variants. A small set of HVR₁ variants was identified that cross-immunoreacted with a large number of HVR₁ peptides, thus suggesting its potential use for the development of vaccine candidates.

Keywords: Hepatitis C virus | Cross-immunoreactivity | Vaccine | Antigenic epitope | HVR₁

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of acute hepatitis and chronic liver disease, leading frequently to cirrhosis and liver cancer. It has been estimated that 170 million persons worldwide are chronically infected with HCV and that there are 3 to 4 million new cases each year [1]. Approximately 70-80% of hepatitis C cases progress to chronicity, about 20% of patients with chronic hepatitis C develop liver cirrhosis,

and 1-4% of these patients develop hepatocellular carcinoma per year [2]. The virus is transmitted via the parenteral route, primarily by direct contact with human blood [3]. HCV is an enveloped virus, containing a single-stranded positive sense RNA of approximately 9.6kb, and classified within the *Flaviviridae* family [2, 4]. The viral genome contains a single open reading frame (ORF) that encodes a polyprotein which is then cleaved into different viral proteins. Three structural proteins have been found, the core protein and two envelope glycoproteins, E1 and E2 [5]. The latter protein has been shown to have protective properties against HCV infection [6]. In this protein, sequence analysis of different HCV isolates has shown two regions with high variability of nucleotide, hypervariable region 1 (HVR1) and 2 (HVR2) [7]. HVR1, which codes for a 27-31 amino acids sequence, is located in the N-terminal part of E2 protein and antibodies to HVR1 have been shown to have protective properties. *In vitro* experiments, using antibodies to HVR1 from a patient serum, have been shown to inhibit attachment of HCV to cultured human fibroblast cells (VH3) [8]. Furthermore, hyperimmune rabbit serum against HVR1 synthetic peptide has been shown to prevent infection of culture cells with homologous HCV [9]. This serum also prevented infection in chimpanzees after *in vitro* neutralization [10]. Furthermore, a serum from a chimpanzee, which had been immunized with a combination of recombinant E1 and E2 protein and HVR1 peptides and recovered from HCV infection of the challenge experiment when anti-HVR1 antibody titer increased, showed protection after *in vitro* neutralization and injection of the mixture in another chimpanzee [11]. These results suggest that immune response to HVR1 might be essential for protection against HCV infection. Moreover, the first chimpanzee, after anti-E1 and anti-E2 antibody titers dropped, was boosted with HVR1 synthetic peptides only and was protected when rechallenged with HCV [12]. However, despite encouraging results, protection offered by a putative HCV vaccine may be isolate specific, against only viral variants that cross-react with elicited anti-HVR1 antibodies. Farci et al. [10] have shown that protection activity of anti-HVR1 antisera was only against homologous strain, whereas viral quasispecies escaped neutralization.

Current vaccine against hepatitis B contains the recombinant hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) [13] and has been used in immunization programs for several years in many countries. HBsAg is expressed as a virus-like particle (VLP), which is better immunogen than denatured or soluble proteins [14, 15]. These advantageous properties have been explored by using HBsAg as a carrier for expression of HCV HVR1 sequence. Lee et al. [16] inserted HVR1 sequence or other E2 protein domains of HCV at amino acid position 113 of HBsAg. In another study, Netter et al. [17] inserted different lengths of HVR1 sequence at position 127, inside the 'a' determinant region of HBsAg. In this case, HVR1 sequence in the hybrid protein showed reactivity against human anti-HCV antisera. Also, HVR1 sequence showed to be immunogenic by injecting mice with the hybrid protein. However, in this construct, antigenic and immunogenic properties of the HBsAg was lost or dramatically reduced by the insertion of the HCV sequences inside the HBsAg sequence.

Here, it is proposed the construction of yeast-derived hybrid proteins, each containing a different HVR1 variant at the N-terminus of a common HBsAg, in order to investigate the antigenic and immunogenic properties of these chimeric proteins. Also, since sequence variability of HVR1 has been a limiting factor in the development of a vaccine, immunization of mice with a mixture of the hybrid proteins that would offer a broader protection was evaluated.

RESULTS

Immunogenic properties of HBsAg presented in the chimeric proteins

Chimeric proteins, along with HBsAg, were used for immunization of mice. Obtained serum samples were analyzed by Ausab for presence of anti-HBsAg antibody. Seroconversion of mice immunized with the chimeric proteins ranged from approximately 78% to 100%. Serum that did not showed anti-HBsAg antibody were excluded from further experiments. In general, anti-HBsAg antibody titers were high.

Immunogenic properties of HCV HVR₁ sequences presented in the chimeric proteins

Serum specimens of mice immunized with the recombinant HCV-HVR₁/HBsAg chimeric proteins were tested for the presence of anti-HVR₁ antibodies. EIA plate wells were coated with HCV HVR₁ synthetic peptides and let react with the serum samples. All anti-HCV-HVR₁/HBsAg chimeric protein serum specimens showed some degree of cross- immunoreactivity with HVR₁ peptides (ranging from 0.06% to 49.4%). Not always the anti-HCV-HVR₁/HBsAg chimeric protein serum reacted with its correspondent HVR₁ synthetic peptide. The differences observed in loss or gain of reactivity was probably due to conformational differences between the HVR₁ sequences in the recombinant chimeric antigens and the synthetic peptides.

For the purpose of development of a vaccine against HCV, it is desirable to have an HVR₁ sequence that will elicit antibodies that immunoreact with a broad range of HCV variants. Thus, using a binary optimization approach, a combination of HVR₁ variants, reacting with a large number of HVR₁ peptides could be identified.

DISCUSSION

Virus-like particles (VLPs) are of particular interest, since they are, in general, more immunogenic than soluble proteins [14, 15]. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) has this property and it has been used as a carrier for the presentation of several virus epitopes, such as epitopes of herpes simplex virus glycoprotein D [20], poliovirus capsid protein [21, 22, 23], HIV [24], and HCV [16, 17]. Furthermore, the current commercial hepatitis B vaccine, available for many years, and that contains VLPs with recombinant HBsAg expressed in yeast cells, has proven to be safe [13, 25].

Development of a hepatitis C vaccine is of global importance. Prevention of hepatitis C infection in chimpanzees was obtained with the use of recombinant HCV E₁ and E₂ proteins as immunogenic material [6]. However, due to the high variability found in HVR₁ of E₂ protein [7], protection from HCV infection has been achieved only against homologous strains [8, 9, 10, 11, 12, 26].

Netter et al. [17] have reported the construction of VLPs made with small HBsAg carrying HVR₁ sequences inside its major hydrophilic region. However, although HVR₁ sequence present in the VLP elic-

ited HVR₁-specific antibodies, immunogenicity of HBsAg was dramatically reduced. In our system, we cloned different variants of HVR₁ sequences at the N-terminus of HBsAg. In contrast to results obtained by Netter et al. [17], in our study, antigenic properties of HBsAg sequence in the VLPs were maintained, as determined by their reactivity against HBsAg. Anti-HBsAg antibody titers elicited by all variants were high and considered to offer protection against hepatitis B virus. Furthermore, anti-HBsAg seroconversion of mice immunized with all chimeric proteins reached over 78% after a 3-dose schedule.

In regard to HVR₁, our results obtained by EIAs have demonstrated that HVR₁ sequences were localized correctly on the outer surface of the VLPs. Also, these VLPs elicited anti-HVR₁ strain-specific antibodies and some of them elicited antibodies that cross-immunoreacted with other strains. Immunoreactivity obtained by EIAs combined with amino acid sequence identity analyses of the HVR₁ variants used in this study did not reveal any amino acid positions responsible for eliciting broad cross-reactive antibodies. However, antibodies elicited by a certain HVR₁ strain cross-reacted more often with strains carrying sequences with higher similarity to the immunogen. In other words, cross-immunoreactivity of antibodies of a serum specimen may be determined by the HVR₁ sequence used as immunogen. Thus, a combination of chimeric proteins, carrying different HVR₁ sequence variants would be ideal to elicit antibodies that cross-react with a broader number of variants [26]. Netter et al. [17] have shown that immunization of mice with a mixture of two chimeric proteins, with each protein carrying a different variant of HVR₁, elicited antibodies against these two variants.

Due to the high variability of the HVR₁ sequences, antibodies with a broad cross-reactivity are desirable for proper virus neutralization. Serum specimens obtained in this study, after immunization with individual, still need to be tested against a larger number of HVR₁ variants in order to obtain a better profile on the breadth of cross-reactivity.

REFERENCES

- 1 Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST (2013) Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 57(4):1333-1342
- 2 Global Burden Of Hepatitis CWG (2004) Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *Journal of clinical pharmacology* 44(1):20-29
- 3 Lindenbach BD, Rice CM (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436(7053):933-938
- 4 Smith DB, et al. (2014) Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. *Hepatology* 59(1):318-327
- 5 Suzuki R, Suzuki T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T. Processing and functions of hepatitis C virus proteins. *Intervirology* 1999;42:145-152.
- 6 Choo Q-L, Kuo G, Ralston R, Weiner A, Chien D, Van Nest G, et al. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:1294-1298.

Tópicos selectos de biomedicina

- 7 Kato N, Ootsuyama Y, Ohkoshi S, Nakazawa T, Sekiya H, Hijikata M, et al. Characterization of hyper-variable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:119-127.
- 8 Zibert A, Schreier E, Roggendorf M. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* 1995;208:653-661.
- 9 Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T, Farci P, Purcell RH, et al. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 1996;223:409-412.
- 10 Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzer A, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyper-immune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15394-15399.
- 11 Esumi M, Rikihisa S, Nishimura S, Goto J, Mizuno K, Zhou Y-H, et al. Experimental vaccine activities of recombinant E1 and E2 glycoproteins and hypervariable region 1 peptides of hepatitis C virus in chimpanzees. *Arch Virol* 1999;144:973-980.
- 12 Goto J, Nishimura S, Esumi M, Makizumi K, Rikihisa T, Nishihara T, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in a chimpanzee by vaccination and epitope mapping of antiserum directed against hypervariable region 1. *Hepatology Research* 2001;19:270-283.
- 13 Shouval D. Hepatitis B vaccines. *J Hepatol* 2003;39:S70-S76.
- 14 Gedvilaite A, Frömmel C, Sasnauskas K, Micheel B, Özel M, Behrsing O, et al. Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology* 2000;273:21-35.
- 15 Schirmbeck R, Bohm W, Reimann J. Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. *Intervirology* 1996;39:111-119.
- 16 Lee I-H, Kim C-H, Ryu W-S. Presentation of the hydrophilic domains of hepatitis C viral E2 envelope glycoprotein on hepatitis B surface antigen particles. *J Med Virol* 1996;50:145-151.
- 17 Netter HJ, Macnaughton TB, Woo W-P, Tindle R, Gowans EJ. Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. *J Virol* 2001;75:2130-2141.
- 18 Granovski N (1997) Recombinant hepatitis B vaccine: the usage of yeast *Saccharomyces cerevisiae* expression system. *Rev Farm Bioq Univ S Paulo* 32(2):61-70.
- 19 Sambrook J & Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- 20 Valenzuela O, Coit D, Medina-Selby MA, Huo CH, van Nest G, Burke RL, et al. Antigen engineering in yeast: synthesis and assembly of hybrid hepatitis B surface antigen-herpes simplex 1 gD particles. *Bio/Technology* 1985;3:323/326.
- 21 Delpeyroux F, Chenciner N, Lim A, Malpièce Y, Blondel B, Crainic R, et al. A poliovirus neutralization epitope expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles. *Science* 1986;233:472-475.
- 22 Delpeyroux F, Peillon N, Blondel B, Crainic R, Streeck RE. Presentation and immunogenicity of the hepatitis B surface antigen and a poliovirus neutralizing antigen on mixed empty envelope particles. *J Virol* 1988;62:1836-1839.

- 23 Delpeyroux F, van Wezel E, Blondel B, Crainin R. Structural factors modulate the activity of antigenic poliovirus sequences expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles. *J Virol* 1990;64:6090-6100.
- 24 Michel M-L, Mancini M, Sobczak E, Favier V, Guetard D, Bahraoui EM, et al. Induction of anti-human immunodeficiency virus (HIV) neutralizing antibodies in rabbits immunized with recombinant HIV-hepatitis B surface antigen particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7957-7961.
- 25 Duclos P. Safety of immunization and adverse events following vaccination against hepatitis B. *Expert Opin Drug Saf* 2003;2:225-231.
- 26 Farci P, Alter HJ, Wong DC, Miller RH, Govindarajan S, Engle R, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7792-7796.

Tópicos selectos de biomedicina,
de Sylvia Páz Díaz Camacho, Eliakym Arámbula Meraz
Verónica Judith Picos Cárdenas, Francisco Delgado Vargas
y Diana Zoeé Gallardo Díaz (coordinadores),
se terminó de editar en noviembre de 2015
en la Dirección de Editorial
de la Universidad Autónoma de Sinaloa.