

Entrevista realizada al Dr. Carlos Lantos el día 12 de noviembre de 2003

El Dr. Carlos Lantos es Profesor Titular Consulto del Departamento de Química Biológica e Investigador Principal del Conicet.



Nos recibió en su diminuta oficina de dos cupulines, con vista al río y a la ciudad, en el cuarto piso de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Química viva: ¿En qué año se recibió?

Carlos Cantos: Mi carrera no es demasiado brillante. En el 51 me recibí de Bioquímico, después hice la tesis en Bioquímica, la presenté en el 58, pero después me fui a EE.UU. y recién la defendí en 1962.

QV: ¿Qué significaba elegir una carrera científica en aquella época? ¿Qué fue lo que lo orientó?

CL: En el secundario me gustaba mucho la orientación en ciencia.

QV: ¿En química o biología?

CL: ¿Qué ciencia me gustaba? Las dos, pero más Biología. La Química sola no, en aquella época se enseñaba en forma demasiado abstracta.

QV: ¿A qué colegio fue?

CL: A "El Salvador". Tenía sus ventajas y sus desventajas. Yo venía de un colegio

francés, pasé mi adolescencia en Liceos Franceses. El sistema Francés es muy severo, muy didáctico, la forma de enseñar es poco estimuladora para un chico de 13 años. Quizás no sea la mejor forma de entusiasmar a un chico de esa edad.

QV: ¿De alentarlo?

CL: Sí, te hacían trabajar mucho, pensar mucho. Me acuerdo que a los 13 años yo sabía como se determinaba un carbonato. Me aburría porque tenía que hacer cálculos y todo eso, y cuando vine acá desde Europa... y bueno, los Jesuitas tenían sus ventajas y desventajas. La desventaja fue que pintaban la vida demasiado fácil. La ventaja es que sabían despertar entusiasmo, sobre todo, porque entre ellos había científicos. Después uno se da cuenta que la investigación no es sólo esto de alentar, es otra cosa. Hay que ver cual es exactamente el papel del colegio secundario: si el de despertar vocaciones o la preparación elemental para la vida profesional.

QV: Es como si fuera una vocación, una actitud curiosa que a uno lo lleva a estas cosas...

CL: Sí, lo que no saben a veces son enseñar la realidad, algunos sí, algunos como el padre Rodríguez, que era médico evolucionista.

QV: ¿Y la Facultad?

CL: Yo tenía amigos y familiares que seguían el Doctorado en Química, pero en ese momento el enfoque del Doctorado en Química estaba muy alejado de lo biológico.

QV: ¿Se decidió por bioquímica o por química?

CL: Yo me recibí de farmacéutico, y después seguí bioquímica. En el ínterin hubo un período político y yo estaba muy metido, era el vicepresidente del centro de estudiantes en una época muy linda, muy romántica, parecía el parlamento inglés. Una conjunción de diferentes corrientes ideológicas, funcionaba muy bien; yo era muy filósofo, como mucha gente en esa época. Nuestro centro de Farmacia y Bioquímica junto con la Línea Recta de Ingeniería eran modelo de convivencia democrática.

QV: ¿Alguna vez sufrió persecución política?

CL: Sí, a mí me echaron del Hospital de Clínicas, donde era practicante, por razones políticas. Entonces no pude seguir la carrera científica. Cuando me recibí, vi un aviso en el diario del laboratorio Johnson y Johnson, para trabajar como ayudante del director técnico. Trabajé allí y después en otros laboratorios farmacéuticos, hasta que se me dio la oportunidad de investigar en la cátedra de De Robertis con

Tramezzani. Ahí hice la tesis, y tuve la oportunidad de irme afuera. Fui a la Worcester Foundation for Experimental Biology, un lugar muy interesante que es la cuna de la píldora anticonceptiva.

QV: ¿En qué ciudad?

CL: Worcester, Massachussets. Había mucha gente, estaba por ejemplo Pinkus, Dorfman, y muchísimos PhD de todo el mundo que se dedicaban a esto, y a otros temas relacionados con esteroides, y sobre todo había mucho dinero. Nunca ví algo así. Por ejemplo, en esa época se inventaron los cromatógrafos de gas, y uno pedía y le traían uno y le decían, bueno, téngalo, y le traían otro, aunque yo no era nadie, y así con todo el mundo. Y sin embargo, yo diría que el nivel científico no fue más alto que aquí, en ese momento. Después volví con Tramezzani al Instituto de Biología y Medicina Experimental; el nivel era alto. Geográficamente en el edificio estaba el Dr. Houssay en el piso de abajo, Leloir en el medio y arriba estábamos nosotros. El nivel realmente fue extraordinario. Por otro lado, yo me acuerdo que el Dr. Houssay cuando volví me dijo ¿qué necesita?, y yo necesitaba por ejemplo un poco de tolueno especial para el contador de centelleo, y me preguntó ¿No se puede destilar el común? Entonces lo llamó a Pedro Cattáneo especialmente por teléfono para ver si había un tolueno más barato. Era volver a la realidad.

En EE.UU. había mucho dinero. Allá, en la misma Fundación donde yo trabajaba, se publicó el primer trabajo sobre la aldosterona, y evidentemente el nivel de algunos era excelente. Pero los que producían los trabajos de calidad eran algunos y otros no, otros aprovechaban, entraban en el montón.

QV: ¿De ahí vino para acá?

CL: Estuve tres años en Worcester, después un año en Canadá, como asociado, volví un poco por razones familiares y otro porque le di mi palabra de honor al Dr. Houssay. De EE.UU. había que volver, porque con la visa J, cumplido un periodo máximo, te mandaban de vuelta, pero como a mí me gustaba trabajar en los esteroides 18- hidroxilados y conocí a una investigadora en Canadá que estudiaba cosas parecidas, me quise ir como asociado. Para ir al Canadá, casi no me dejan salir de EE.UU. por la visa. Entonces me dijeron que el único que podía “arreglar la situación” era el Dr. Houssay. En esa época, si él estaba de acuerdo podía ir. Por suerte él estaba en EE.UU en ese momento crucial. Entonces lo fui a ver y me dijo: “Sí claro, Ud. quiere ir para no volver”. Le empecé a explicar la importancia que tenía el tema y la conexión ocasional con una investigadora en Montreal y él me dio permiso, pero siempre y cuando, regresara al país.

QV: ¿Y ahí entonces volvió al IBYME?

CL: Y volví al IBYME, al mismo laboratorio de neurobiología.

QV: ¿Y cómo llegó acá a la facultad?

CL: Me trajo el Dr. Cardini.

QV: ¿Lo invitó a participar en el departamento?

CL: Sí, primero para dar clases.

QV: ¿De qué materia?

CL: Química biológica, yo dictaba las clases de hormonas. En un día daba toda la parte básica, la materia estaba dirigida por la Dra. Mary Tomio, Empecé esas clases con las tiroides y terminé con las hormonas sexuales y con el ciclo sexual. Entonces Mary decía, bueno, ahora el Dr. va a hablar de algo que no lo va a tomar en el examen. Todo el mundo preguntaba de qué iba a hablar, y yo decía del ciclo sexual de la mujer. Después de tres horas, nadie se fue, todos querían saber como funcionaba y después hacían todas las preguntas para ver cómo evitar el embarazo mediante los conocimientos adquiridos.

Me gustaba mucho dar esas clases, y después ya me quedé porque me llevaba muy bien con todos los docentes.

QV: Acá armó un laboratorio con gente para trabajar en investigación?

CL: Sí, espontáneamente se formó un grupo interdisciplinario con gente que vino conmigo y otros que se fueron incorporando.

Cristina Damasco fue tesista mía, y antes que ella su primo Miguel Borruel hizo la tesis conmigo, él fue mi primer tesista, hizo su tesis en un tema que todavía estamos estudiando, la relación entre las bioaminas y esteroides. Ahora terminó la tesis Marisa Zallochi, en el mismo tema.

QV: ¿Cómo surgió la materia química fisiológica?

CL: Surgió un poco porque yo estaba en la línea de la adrenal, además del curso de química biológica II. Cuando uno da el curso de adrenal debe saber toda la fisiología.

QV: Porque integra todo...

CL: Por el efecto pleiotrópico de los glucocorticoides. Hay receptores específicos a glucocorticoides en casi todos los tejidos y para enumerar los efectos de estas hormonas no alcanzaría el espacio de esta entrevista. Entonces pensé: "bueno ya que tuve que estudiar toda la fisiología, voy a transmitir lo que sé". Es una materia que ahora no es tan necesaria, porque yo veo que los que dictan química biológica

básica tienen un enfoque más biológico. En esa época estaba muy divorciada de la fisiología que era el otro extremo y ahora hay una tendencia más bien a integrar. Como dije antes cuando yo empecé los estudios universitarios, la orientación en esta facultad era fisicoquímica y aún cuántica. En cuanto a la Química Biológica, se enseñaba en esta facultad con un enfoque primordialmente preparativo y analítico. Después comenzó en el área Química Biológica de esta Facultad una segunda etapa de neto corte enzimológico, que tampoco llegó a la integración fisiológica. En ese momento, aproximadamente aparecí yo en escena y me pareció que con la enseñanza de la química aplicada a la fisiología se llenaba un vacío. Y lo más importante fue que al Dr. Cardini, en ese momento jefe de departamento, le pareció lo mismo y tuvo la bondad de apoyarme. El paso en el momento actual es la complementación de lo anterior con la Biología Molecular, paso que yo no estoy en condiciones de dar por razones generacionales, y que está dando principalmente Adalí Pecci.

QV: ¿Estuvo en la Antártida? ¿Qué estuvo haciendo allá?

CL: Estuve estudiando otra hormona, suponemos que es una hormona muy complicada, la hormona que regula el balance ácido-base. Los vertebrados pulmonados marinos tienen un grave problema de adaptación por estar horas debajo del agua, les falta oxígeno y lo que sobra son protones. Lo que no pueden eliminar por vía respiratoria, lo deben eliminar por orina. Pero, mientras la regulación de la frecuencia respiratoria está gobernada por el bulbo raquídeo y está bajo control nervioso, la eliminación de protones por orina implica un cambio que ocurre a nivel metabólico bajo señal hormonal. Entonces empezamos a estudiar las suprarrenales de las focas para encontrar la señal...

QV: ¿Estuvo viviendo allá?

CL: Estuvimos dos meses, una campaña de verano.

QV: ¿Recogían muestras?

CL: No sólo recoger muestras, ya que había un laboratorio instalado, se hacían los primeros pasos de investigación, la purificación. Se llegó al extracto crudo.

QV: ¿Esa investigación sigue?

CL: Sigue sí, pese a que es muy complicada. La gente no quiere meterse en cosas que no van a dar resultados inmediatamente, a los efectos de su promoción.

QV: La desesperación por el "paper" "Publish or perish". La investigación está muy condicionada por la inmediatez...

CL: Sí, y es un grave defecto en todo el mundo, no sólo nuestro, pero acá el problema se agudiza por nuestra idiosincrasia y por la escasez de medios. Pongámonos de acuerdo sobre el fin de cada investigación. Este es el adelanto del conocimiento en sí, en el tema abordado. Si se acompaña de una promoción individual, mejor. Pero la promoción viene en segundo lugar. Lo que realmente importa es el adelanto de la ciencia, objetivo que nunca se debe perder. Este enfoque requiere una mística, indudablemente, cierto grado de abnegación y sacrificio. Los criterios para la evaluación en general- número de "papers", posición del autor, quizás un poco mejorado por indexación de la revista- no ayudan. No son justos y entonces, muchas veces la distancia entre recompensa (promoción) y estímulo es demasiado grande.

QV: ¿No hay una forma alternativa de juzgar?

CL: Hasta el Dr. Houssay decía que no es bueno juzgar solo por el número de publicaciones, pero, decía él, ¿que otra cosa hay para juzgar? Con todo respeto esto ahora ya no rige o por lo menos no debería regir. Requiere de un estudio más profundo de la persona y su producción, de la publicaciones en general, un estudio que en sí mismos insume mucho tiempo. Trascendencia del tema, trascendencia no sólo en el sentido de "transmitir en el mundo" sino también el de "perdurar", "tener importancia". Originalidad, citas de sus pares y cómo y en qué contexto lo citan etc. La evaluación es una ciencia aparte bastante complicada. En el mundo no siempre se hace bien, y aquí se hace peor. En consecuencia estamos viviendo un poco la mediocridad, a veces hay trabajos que no se publican porque éste quiere estar en primer lugar, el otro quiere estar en último lugar y el otro no quiere estar en el medio. Hay ejemplos paradigmáticos en sentido correcto: Houssay, por ejemplo, publicaba sus resultados trascendentales (en ambos sentidos de la palabra) sobre el sistema porta hipotálamo-hipófisis en la revista de la Sociedad Argentina de Biología, y también en revistas locales la mayor parte del papel diabetógeno de la anterohipófisis. Ambos temas tuvieron una trascendencia muy grande que hoy perdura... Así que a veces uno no sabe cómo, pero las cosas trascendentes se hacen públicas y perduran sin aplicar un sistema especialmente conocido de evaluación.

Quizás otra forma de encarar esto, en esta época poco romántica y muy competitiva, sería "despersonalizar" los trabajos. Poner los autores por orden alfabético. Es lo que hicieron Silvia y Jim Tait, que hace cincuenta años, publicaron el trabajo fundamental sobre la estructura y acción biológica de la aldosterona. Pusieron los autores por orden alfabético y el primero era un colaborador, no el más importante, cuyo nombre empezaba con "A". Esto, en algunos casos, resolvería problemas de competencia y ayudaría a privilegiar el adelanto de la ciencia.

QV: ¿Es más importante el protagonismo que el descubrimiento?

CL: A veces el protagonismo es como una necesidad, porque si no la persona se queda sin beca, sin trabajo. Hay que cambiar esto, yo creo que ya estamos yendo

para atrás en calidad, hay más cantidad que calidad

QV: Parece, a veces, que se contradice al respecto...

CL: Bueno, es que a veces la parte humana “vence” y uno cede ante los requerimientos de supervivencia...

QV: Pero la falta de inversión me parece que se nota, desde la época de Houssay a ahora la inversión en ciencia...

CL: Indudablemente. Las últimas noticias al respecto son alarmantes, parece la historia del burro al que acostumbran a quedarse en ayunas hasta su muerte. La manera de “jugar” con los investigadores, sobre todo con los de cierta edad es francamente repugnante... Ya dijimos que, comparado con lo que ocurrió a mitad de siglo, las cosas han cambiado. Queda en pie que aquí, antes, y anécdotas aparte, los científicos no sólo mezclaban genio con ascetismo, sino que además, eran respetados y tenían sus necesidades cubiertas.

QV: ¿Cómo llegó su nueva relación con la industria y cómo se llegó al desarrollo de la patente?

CL: Esto fue hace relativamente poco. Fue como consecuencia de investigaciones básicas multidisciplinarias. Nadie pensó, al principio, en patentes.

QV: Ud. tenía una investigación... y ¿cómo se les ocurrió contactar la industria?

CL: Eso es lo que te digo, cuando nosotros comenzamos a trabajar con Gerardo (Burton) hace más de 20 años, cuando vos le hablabas de hipocampo, decía, ¿ dónde estaba el bichito, el caballito de mar? No, ahora, es un excelente conocedor de la biología, y poco a poco, se llega al cuasi-ideal de la integración multidisciplinaria, cuando todos se entienden entre sí. El ya era un especialista en modelos moleculares, las conformaciones espaciales tan trabajadas y divulgadas por Derek Barton. Hace medio siglo no se sabía mucho de esto. Tan es así que en el curso de esteroides de EE.UU., a principios de la década del 60, no lo vimos, nadie habló de conformación y bueno, cuando empezamos a hacer modelos, los simples modelos “balls and sticks” así como algunos parámetros de espectroscopia NMR, vimos que entre los mineralocorticoides (retentores de sodio) y los glucocorticoides (rol pleiotrópico descrito más arriba) existentes en la naturaleza había una diferencia neta en la conformación (arquitectura tridimensional). Esto dio lugar a un trabajo muy extenso y típico de aquella era quijotesca. Gerardo se puso a sintetizar como loco compuestos con ambas conformaciones –las de los mineralocorticoides y de los glucocorticoides-, pasando gradualmente de una conformación a otra, para ver si se trataba de un fenómeno universal, o sea, si partiendo de la observación biológica, podíamos postular una original correlación

estructura (i.e. conformación)-acción biológica generalizada. En otro lado hubieran aprovechado enseguida y hecho todo en secreto, acá no, él empezó a sintetizar (actualmente ya van como 50 productos por lo menos) sin ningún interés comercial, para ver que pasaba.

QV: ¿Y lo probaban en qué sistema?

CL: Primero probábamos la retención de sodio, la síntesis de glucógeno, en ratas adrenalectomizadas y después en la última etapa, en el pegado del receptor específico, que, entre paréntesis, no era tan específico. Moléculas planas, más bien eran características de los mineralo- y moléculas con cierto ángulo, de los glucocorticoides. Era una de las cosas importantes, se publicó en muy buenas revistas. La otra cosa era que curiosamente la secuencia de los eventos no fue la esperada. Lo lógico hubiese sido que la “pegada a receptor” fuese lo que mejor correlacionara con el parámetro conformacional (planaridad vs. torsión). Pero lo que mejor correlacionaba resultó ser el fenómeno biológico en sí.

QV: ¿Lo cual se explicaría por que hay más de un tipo de receptor para cada molécula?

CL: Dentro del mismo receptor, hay varios sitios, cosa que poco a poco se está viendo, pero esa era una parte de la explicación. Quedaba el hecho atípico, la paradoja o “conundrum” como lo llaman, que la biología prevalece sobre la fisicoquímica en este aspecto. Lo cierto es que, como decía Roseblit, uno de los padres de la cibernética, “el único que tiene razón es el gato vivo...”. La hormona prefería una u otra proteína-(receptor, portadora, enzima) etc... a medida que las proteínas “aparecían”, probablemente por existir mejor adaptadas para cada momento. No es el receptor solo, sino todo lo que, de alguna manera u otra tenía que ver con la actividad en sí... Por ejemplo, con la “especificidad tisular” dependiente de enzimas, con la que quizás el público especializado esté más familiarizado.

QV: O sea que un entorno celular podía modificar la unión

CL: Eso por supuesto, también. El tema es lo suficientemente complicado como para dar lugar a una charla aparte. Quedémonos ahora con la idea de que toda esta utopía interdisciplinaria que mezclaba síntesis y conformación moleculares con algo que a todas luces tenía que ver con la evolución y el desarrollo, para explicar relaciones entre estructura de pequeñas moléculas y función biológica. Toda esta utopía, digo, significaba-sin que nos diéramos cuenta enseguida- un nuevo enfoque terapéutico que tentaba a la industria. Bueno, en una de las visitas periódicas que al Laboratorio efectuaba Jesús Tresguerres, un investigador español que, hace muy poco, editó un libro de fisiología, me pregunta: ¿Qué están haciendo? Entonces le contamos que a raíz de estos ensayos, y en gran medida, debido al azar, -hay que reconocerlo- encontramos una molécula que tenía propiedades de un

antigluocorticoide. El problema de los antigluocorticoides es que en general tienen reacciones cruzadas, sobre todo con antiprogestágenos, que son abortivos y desarreglan el ciclo menstrual. A raíz de toda esa "locura" básica, que nunca se pensó que iba a llegar a algo más, de repente, se encuentra un nuevo enfoque para un antigluocorticoide "puro" sin propiedades a veces indeseadas. El único antigluocorticoide que existe en el comercio es, al mismo tiempo, abortivo. Se produce entonces el siguiente diálogo entre Jesús y nosotros, demostrativo para entender un montón de asuntos relacionadas con patentes:

JT: ¿Lo habéis publicado?

Nos: aún no, pero ya está aceptado y por publicarse.

JT: ¡No lo publiquen!

Nos: ¿Cómo qué no? ¡Que de las publicaciones vivimos!

JT: Si lo queréis patentar debéis esperar. Una vez publicado, el conocimiento es de dominio publico...No sirve para patentar. Por lo menos esperad a iniciar los trámites.

QV: ¿Uds. lo sintetizaron y le pasaron a alguien el protocolo de síntesis?

CL: Primero empezó todo un período de retención de la publicación, consecuencia del diálogo con Jesús. Tuvimos buena colaboración de la revista Molecular Pharmacology- que a nuestro pedido retuvo la publicación del manuscrito aprobado, hasta tanto se presentara la solicitud de patente.

Todo, la propiedad fue de la Universidad, los inventores fuimos Gerardo y yo y con buen criterio, participaron todos los autores, por lo menos del trabajo este.

QV: ¿Todos ellos en la patente?

CL: Digamos que de hecho participaron todos en la patente, oficialmente dejando en claro esa colaboración, éramos Gerardo y yo...

QV: ¿Patentaron varios productos?

CL: Sí, digamos, el antigluocorticoide primero, era lo que se llama la "leading molecule" y después variantes, que mejoraron las propiedades. Con la UBA, con la FCEN en particular, tuvimos suerte, con otros organismos, no. Les interesó, y tuvimos la excelente colaboración del Decano Recondo; esto fue en el 96. Entretanto la UBA vendió la patente a Serono International. Y se firmó un convenio.

QV: ¿Uds. están haciendo investigación, llamémosla, básica? ¿Lo hacen en la

facultad?

CL: Sí, la hacemos en la Facultad. Colaboran cuatro laboratorios europeos vinculados a Serono.

QV: ¿Uds. les dan el producto?

CL: Sí, le damos lo que sintetizamos. No sé si se dan cuenta lo que significa, pasar de sintetizar 20 mg a 200 mg, y de éstos, a dos gramos. Hay trabajos muy importantes que se limitan a describir este escalamiento, esa parte la hacen acá y ensayos de biología molecular, y algunos fisiológicos también se hacen aquí.

QV: ¿Ven actividad en cultivos?

CL: Si, trabajamos con células Cos. Uno empieza con ensayos de biología molecular, que desde el punto de vista práctico-, y por lo que dijimos antes (limitaciones impuestas por la cantidad de producto) sirven como screening... es cierto que no siempre y solo hasta cierto punto. Por supuesto, al mismo tiempo se descubre un Nuevo Mundo desde el punto de vista de los mecanismos de acción. Con células, digamos, uno llega hasta apoptosis, Esto lo está haciendo Adalí en colaboración con alguna gente del grupo del Hospital de Clínicas. Están muy entusiasmados. En Europa se hacen entre otros, ensayos toxicológicos y de interrupción de la preñez, para distinguirnos de los productos existentes...

QV: ¡Qué bueno!

CL: La alta relación antiglucocorticoide /antiprogestágeno es, por supuesto, uno de los principales parámetros terapéuticos buscados. También el predominio de algunas propiedades glucocorticoideas sobre otras, especialmente en el terreno de la inmunosupresión...

QV: ¿Tiene un nombre el compuesto?

CL: Ellos lo llaman 21-OH-6OP, ya se publicó la fórmula, ya no hay secreto. Está la patente de la Oficina Europea de Patentes y la patente en EE.UU.

QV: ¿Entonces, por eso se está empezando?

CL: Pero carecemos de la infraestructura para producir en mayor escala. Porque el otro problema es que la cantidad para las fases posteriores es tan grande y además requiere ya el escalamiento de la producción, eso lo tiene que hacer el laboratorio que elija Serono. Aquí se están haciendo pruebas de biología molecular y se hace una especie de "screening".

QV: ¿Para tratar a los pacientes?

CL: En última instancia, sí, para usarlos *in vivo*, pero para esto falta. Ahora, un “screening” cada vez más complejo de cuales compuestos usar, hay en danza como 20 productos, todos parten de la misma molécula. Ese “screening” lamentablemente tiene un alcance limitado.

QV: ¿Puede ser que el organismo lo altere?

CL: Claro. Hay una anécdota famosa de Faraday. Estaban en la Royal Society y una persona al ver una chispa por primera vez le dijo: ¿Dígame para qué sirve? Faraday le respondió que es lo mismo que preguntar para qué le sirve al mundo un niño recién nacido. Lo cierto es que, siguiendo con la parábola, transcurre cada vez menos tiempo entre el recién nacido y el adulto; entre la investigación básica y su aplicación al campo que fuere. Yo creo que estamos llegando poco a poco a las etapas clínicas.

QV: Nos contaron que una vez pasaba por una iglesia con unos frascos de sulfúrico. ¿Cómo es la anécdota?

CL: Sí, aunque no sé muy bien, qué tiene que ver con lo anterior. Se casaba el hijo del almirante Rojas, entonces, y yo estaba esperando a mi mujer en la iglesia del Socorro. Entonces se acercaron dos tipos y me dicen: ¿qué es esto? Y me llevaron a la comisaría, porque tenía dos frascos de sulfúrico, y después llamaron al laboratorio. Menos mal que atendió un japonés, serio, porque cualquier otro hubiera dicho para bromear: No, no lo conocemos.

QV: ¿ Y les aclaró que Ud. era el jefe?

CL: Sí, había comprado para hacer yodo proteico, y no sé si se acuerdan de Fernández Berlusconi Roca. Ellos me decían: lléveselo y lo que no le sirve lo trae de vuelta.

QV: Entonces, estuvo demorado.

CL: Sí, pero salí enseguida. Si hubiese pasado años después, no sé lo que habría pasado...

QV: ¿ Qué cosas han cambiado y que cosas están igual que cuando Ud. empezó a trabajar en la UBA? ¿Lo bueno y lo malo?

CL: A mí me gusta trabajar en la facultad. Lo que está igual en la facultad, es el grado de convivencia y de nivel intelectual, eso se mantiene, con la variante, el factor ideológico, que tiene menos peso que antes, lo cual también tiene sus

ventajas y desventajas, porque por un lado, hay menos conflictos, pero por otro hay menos idealismo, menos compromiso. Es impresionante lo que cambió todo la informática, la mística cambió, antes el egoísmo era diferente, antes existía el Señor de la Ciencia, Existió la reforma del 18, pero esta se aplicaba sobre todo en los Claustros. En ciencia seguía una jerarquía, en general bastante arbitraria, pero ejercida por gente que sabía. Acuérdense de la anécdota que les conté: en EEUU por ejemplo uno pedía "por favor no me echen todavía" y el que decidía era Houssay. Parece mentira. Yo tuve suerte, y me parece que fue productivo, esa suerte, para lo que después pudimos hacer, pero otros no. Cambió mucho las cosas la informática.

QV: ¿ Democratizó la información, el acceso a la información?

CL: Sí, democratizó y la gran pregunta, que yo no tengo resuelta, es si democratizó para arriba o para abajo, porque evidentemente los sistemas informáticos permiten cierta justicia, pero hay un cerebro detrás de esto, la computadora no piensa. Uds. habrán oído el asunto de la angiotensina, de Braun Menéndez y Page, investigador norteamericano.

QV: ¿ Se peleaban por el nombre que había que ponerle?

CL: No, no se peleaban, esto es lo interesante. Y ahora voy a hablar de algo en que no participé, que en parte es conocido y en parte me contaron otras personas. Uno lo llamó hipertensina, y el otro angiotonina. En homenaje a la unidad panamericana, y reconociendo la simultaneidad de los trabajos, unieron las dos partes de la palabra. Pero el que se dio cuenta de que la renina era una enzima era, según mi relatora, Leloir. También intervino el Dr. Paladini que aun está en actividad. Leloir nunca pretendió estar en primer lugar de nada. A veces ni figuraba...pero indudablemente perduró.

QV: Yo lo escuché en una charla en la Academia.

CL: Si, hubo cierta discusión sobre la paternidad. En realidad, creo que Houssay tuvo la idea y la ejecución quedó en manos de Taquini, Leloir, Braun Menéndez, Fasciolo, Paladini y otros que se me escapan. Pero que yo sepa, nunca hubo mayores discusiones. Aún lo de la paternidad es discutible, ya que, como dije, las cosas se discutían abiertamente y la idea probablemente surgió de todos, de varias conversaciones.

QV: ¿ Ahora esa discusión quedaría en el marco del IBYME o de una sociedad?

CL: Ahora, después de cincuenta años, la revista *Hypertension* editó un homenaje a los 50 años de la angiotensina, que por casualidad coinciden con los 150 años de la fundación de la Universidad Buenos Aires El preámbulo de este número

extraordinario de *Hypertension* escrito por su redactor en jefe termina con una “Happy birthday Angiotensin, Happy birthday University of Buenos Aires”.

QV: ¿ En dónde se hacían las discusiones?

CL: Las discusiones eran en el mismo IBYME; lo más interesante fueron los desayunos, especialmente los del sábado a las 10 de la mañana. Era todo muy informal, ahora la gente se cuida antes de decir las cosas y ahí no, entonces ahí uno ve también las falacias de lo nuestro. ¿Que valor asignarle a que Leloir haya descubierto la enzima? Si lo evalúa por “papers”, no tendría valor. Leloir se sentía muy seguro de sí mismo, a pesar de que allí también hubo injusticias, porque Cardini tenía el mismo mérito que Leloir en los descubrimientos sobre hidratos de carbono de reserva. Sin embargo, ¿por qué no le dieron el premio Nobel?

QV: Siempre en todo, hay cuestiones personales, es muy difícil sacar lo subjetivo, se pretende con los “papers” poner objetividad, pero tampoco la dan.

CL: Yo no sé quizás se mejoró algo gracias a la estadística, a la indexación de revistas evidentemente no es lo mismo publicar en Anteojo que en una revista de buen nivel con árbitros internacionales severos. Está también el Citation Index... quizás así se llega a un mejor nivel de objetividad.

QV: ¿Pero no debería ser sólo un elemento?

CL: Si, y vean los ejemplos anteriores. Sí, la evaluación es una cosa muy importante, no se la puede dejar solamente ahí. Por ejemplo, en Europa, y muchos lados la evaluación se hace en base a la competencia, de acuerdo al cargo, y que gane el mejor.

QV: ¿Y cómo cree que se decide quién es el mejor?

CL: Hay gente que es capaz de decir quien es el mejor, yo conozco a varios. Y que además tienen la objetividad, en última instancia, la honestidad suficiente...

QV: ¿Como formador de becarios, que cambió?

CL: Eso depende mucho del formador, de uno mismo. La dispersión entre los formadores de gente, tanto antes como ahora, es y fue tan grande, que es muy difícil hacer comparaciones entre épocas

QV: Un último comentario...

CL: Creo que esta dispersión es, en cierta medida, general. Siempre hubo buenos,

malos y mediocres y también gente que rumbea hacia un lado u otro según su madurez.El continuo "si...pero"...en esta entrevista no es más que la expresión del deseo de objetividad, el de juzgar a cada individuo y su actuar en su entorno y a su medida.

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**

Vol. 2, número 3, 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Transgénicos: elementos para entender una polémica

Recibido 2 de noviembre de 2003/ Aceptado 20 de noviembre de 2003

Por Ana María Vara*



La polémica internacional sobre transgénicos ha alcanzado en 2003 niveles inéditos. La oposición europea, que cristalizó en una legislación sobre etiquetado sumamente estricta, y la entrada en vigencia del Protocolo de Cartagena en septiembre pasado -con su escurridiza versión del principio de precaución, que traerá más de una complicación al comercio internacional- marcan dos puntos de inflexión de una discusión pública que se resiste a alcanzar un desenlace.

Más allá de que en los foros internacionales la polémica se presente muchas veces como una cuestión que debe abordarse sólo en términos científicos-en términos de riesgo-, lo cierto es que detrás de ella hay muchos otros aspectos que están cumpliendo un papel importante. Como explicó en el último seminario que dictó en la New York University Dorothy Nelkin, una de las más respetadas sociólogas de la ciencia, fallecida recientemente, las discusiones en torno a transgénicos han excedido el marco de las consideraciones científicas, para convertirse en debates sobre la calidad de los alimentos, sobre la autonomía cultural, y sobre la globalización. En esta línea de trabajo, Nelkin sigue a Chaia Heller, la autora de *Ecology of Everyday Life*, quien en un artículo reciente define estos debates como "la colisión entre marcos conceptuales que compiten."

Cambios en la relación ciencia-sociedad y conflictos de interés

Para comprender mejor nuestra situación como país productor y exportador de transgénicos, es

importante que tengamos en cuenta estos aspectos. Sin dudas, la polémica sobre organismos genéticamente modificados representa uno de los casos más interesantes para reflexionar sobre cómo ha cambiado la relación ciencia/sociedad en los últimos 20 años. En especial, en los países desarrollados, donde esta discusión pública ha alcanzado los tonos más exaltados -en uno y otro extremo.

Uno de los aspectos más notables tiene que ver con cuestiones de financiación de la ciencia; sobre todo, la relación de la ciencia con las empresas. El hecho de que, a partir de los '80, primero en los Estados Unidos y luego en Europa, se haya incrementado fuertemente la inversión privada en ciencia, como muestran los trabajos de D. Blumenthal y Sheldon Krimsky, dos expertos en temas de ciencia y sociedad, ha modificado radicalmente las formas de producción y apropiación del conocimiento. Que un porcentaje importante de los expertos en biotecnología de los países desarrollados trabajen con dinero de la industria o sean fundadores o socios de empresas biotecnológicas -que más temprano que tarde terminarán siendo compradas por grandes compañías- ciertamente cuestiona muchas de las ideas tradicionales sobre qué es hacer ciencia, qué significa integrar una comunidad científica. Y parece poner en suspenso la categoría de "experto independiente."

No hay casi estudios sobre estos conflictos de interés -y cómo pueden afectar el buen juicio científico- en el ámbito de la biotecnología. Pero sí ya se han publicado trabajos en revistas médicas, como el *New England Journal of Medicine*¹ y el *Journal of the American Medical Association*², sobre todo en relación con evaluaciones sobre la efectividad de los tratamientos. Y son bastante contundentes. Estos estudios han llevado a las revistas científicas a ir modificando paulatinamente sus políticas de "disclosure" con respecto a los autores: cada vez piden más información sobre las fuentes de financiamiento de su trabajo -no sólo presente.

Estas cuestiones pueden estar detrás, ciertamente, de un aumento de la desconfianza pública hacia la ciencia en general. En los países desarrollados. En el nuestro, donde la ciencia la financia casi únicamente el Estado, la situación es diferente: las encuestas indican que la comunidad científica tiene un alto grado de credibilidad.

Otro aspecto importante es la nueva legislación norteamericana y europea que concede amplios derechos de propiedad intelectual sobre los seres vivos, sus partes y sus productos -en particular, las patentes sobre genes- que puede afectar el desarrollo de la ciencia y el interés público, como comenta Nelkin³. Con el otorgamiento de la primera patente sobre un ser vivo, en 1980, se abrió ciertamente un nuevo capítulo en nuestra relación con la naturaleza. Para algunos, es un dilema ético: estaríamos ante un nuevo avance, intolerable, sobre la naturaleza. Otros ponen más el acento sobre quiénes son los dueños de las patentes. Lo que está fuera de toda duda es que la nueva legislación sobre patentes biotecnológicas representa un intrínquilis jurídico que va a llevar años desanudar. Y esto es sobre todo un desafío para los países en vías de desarrollo.

En este sentido, considerando la importante inversión en investigación y desarrollo de las compañías multinacionales, el hecho de que las patentes de la enorme mayoría de los eventos transgénicos aprobados y comercializados hasta el presente pertenezcan a media docena de empresas transnacionales, representa una realidad que preocupa a muchos. A su vez, estas empresas crecieron y se hicieron más poderosas en los '90 gracias a un proceso fuerte de

adquisiciones y fusiones.

Percepción pública y distribución del riesgo

Por otra parte, en el debate internacional sobre transgénicos también influyen cuestiones que tienen que ver con la percepción pública del riesgo. En este sentido, debemos considerar aspectos que tienen que ver con la transparencia y la "*accountability*" de los organismos públicos, que en Europa han sufrido los embates de una serie de escándalos recientes. Como sugieren algunos autores, en Europa parece haberse modificado el pacto de confianza de la población con los organismos regulatorios, a raíz del problema de la vaca loca en Gran Bretaña, o de la sangre contaminada en Francia, entre otros. Otros encuentran antecedentes hasta en cómo se manejó la contaminación derivada del accidente de Chernobyl, en particular en Gran Bretaña.

Otro elemento importante tiene que ver con la distribución del riesgo que toda nueva tecnología supone: los transgénicos en uso hasta ahora tienen ventajas que sobre todo benefician a los productores, mientras el supuesto riesgo de su consumo sería afrontado por los consumidores. Algunos autores señalan que este problema se superaría en cuanto salgan al mercado transgénicos que presenten ventajas nutricionales-como el llamado "golden rice", que permitiría paliar en parte carencias vitamínicas de poblaciones de Asia.

El experto en bioética Gary Comstock señala otra peculiaridad en el ámbito de la percepción del riesgo, que podría estar cumpliendo un papel importante en Europa, Japón y hasta los Estados Unidos. Se trata de un fenómeno que él denomina "*tainting effect*"-"efecto contaminante". Se ha demostrado que, en presencia de alimentos abundantes -como ocurre en los países desarrollados-, las afirmaciones negativas sobre un alimento tienen más efecto en los consumidores que las positivas. Esto, sumado al problema de la distribución del riesgo, arroja otra luz sobre la renuencia de estos consumidores. Son economías de alto poder adquisitivo e importadoras de alimentos, que pueden pagar sobrepagos absurdos -como lo están haciendo con los alimentos orgánicos.

A esto se agrega que la tecnología de transgénicos tiene que ver con la genética, un ámbito de conocimiento al que se atribuyen poderes muy peculiares, como analizan Nelkin y Lori Andrews en su libro *The DNA Mystique*, que ayudan a explicar por qué el riesgo asociado con las tecnologías de ADN se percibe casi en los mismos términos que el riesgo asociado con la energía nuclear. Paul Slovic, un experto en percepción de riesgo, ha realizado investigaciones que muestran que todo lo que tenga que ver con el ADN se asocia culturalmente con un alto nivel de riesgo, comparable con las asociaciones que se establecen con la energía nuclear, otro tema que desata polémica⁴.

Por otra parte, los transgénicos llegan a la consideración pública en un momento en que existe una creciente sensibilidad hacia los temas de medio ambiente, y nuevas formas de activismo, representadas por organizaciones no gubernamentales como Greenpeace o Friends of the Earth, entre otras. Algunas líneas dentro de estas corrientes, las llamadas "*deep ecology*", son además, fuertemente anti-tecnológicas. Estamos en presencia de nuevos actores sociales y políticos, cuya

influencia es importante. Estos actores tienen una alta credibilidad también en nuestro país; aunque no son necesariamente los sectores más radicales.

La emergencia de una oposición a los procesos de globalización, que en particular en Europa toman la forma de resistencia a la "americanización" de la cultura, también tiene influencia. En algunas formas de estas protestas, los alimentos adquieren un valor simbólico: recordemos las acciones del agricultor francés José Bové, quien protestó contra la comida rápida lanzando queso roquefort contra locales de McDonald's⁶.

La mirada europea

En relación con las protestas de Bové, yo agregaría dos elementos más, que son puramente europeos. Uno tiene que ver otra vez con los alimentos: creo que los procesos de estandarización de la producción que se están llevando a cabo dentro del marco de la Unión Europea han vuelto a los consumidores -y a los productores- muy sensibles estas cuestiones. Los *chocolatiers* franceses, por ejemplo, se quejan de que ahora se podrá hacer chocolate en Francia agregando otros aceites, más allá de la manteca de cacao. Esto es para acomodar los estándares franceses a los británicos. Y hay muchos otros ejemplos asociados con el valor simbólico de los alimentos, que tanto han contribuido a delinear las identidades nacionales en Europa.

El segundo tiene que ver con la noción de naturaleza en Europa, un continente que no tiene casi áreas protegidas, áreas prístinas, salvajes. La naturaleza, para un francés, un británico, un alemán, un italiano, es la campiña: la granja, el viñedo, la villa. Esos sentimientos espirituales que se suelen asociar a la naturaleza, en este contexto quedan asociados a las explotaciones agrícolas. Entonces, cobra más importancia simbólica lo que suceda en la granja.

Finalmente, también hay que tener en cuenta los intereses comerciales. Está claro que Europa, que subsidia fuertemente a sus productores, no necesita aumentar su producción de *commodities*, ni está especialmente preocupada por bajar los costos de producción de alimentos. Y los primeros transgénicos aprobados son *commodities*. La oposición de sus consumidores a los transgénicos le resultó muy funcional a la Comunidad Europea para cerrar en parte sus fronteras a estos productos, y relanzar su política de productos de calidad -"quality food"- con denominación de origen. Que también les ha servido para embarrar la discusión sobre los subsidios agrícolas⁷. Algunos autores hablan ahora de una nueva noción, la de geoeconomía, reemplazando la clásica de la Guerra Fría, geopolítica. Algunos de los sectores que apoyan los transgénicos en Europa, no casualmente, son los que pueden ganar con ellos, como la industria biotecnológica. Revisar un poco qué hay detrás de la polémica sobre transgénicos nos puede dar pistas para comprenderla. Además de representar una ocasión para reflexionar sobre las diversas dimensiones que están involucradas en la producción, distribución y uso del conocimiento científico. Y cómo están cambiando.

* Periodista científica e investigadora en temas de ciencia y sociedad del Centro de Estudios de Historia de la Ciencia "Jose Babini", de la Universidad Nacional de General San Martín y egresada

del Master of Arts in Media Ecology-Studies in Communication, New York University.

Referencias

1. Stelfox H. T., Chua G., O'Rourke K., Detsky A. S. "Conflict of interest in the debate over calcium-channel antagonists," *New England Journal of Medicine*; 338:101-106, January 8, 1998.
2. Justin E. Bekelman, Yan Li, and Cary P. Gross, "Scope and impact of financial conflicts of interest in biomedical research: a systematic review," *JAMA* 2003 289: 454-465.
3. Nelkin, Dorothy, "Patenting genes and the public interest," *AJOB*, Summer 2002, Vol. 2, number 3, pp. 13-5.
4. Paul Slovic, "Perception of risk," *Science*, Vol. 236, April 17, 1987, pp. 280-5.
5. Paul Wapner, *Environmental Activism and World Civic Politics* (Albany: State University of New York, 1996).
6. Chaia Heller, "From scientific risk to paysan savoir faire: peasant expertise in the French and global debate over GM crops," *Science as Culture*, Vol. 11, Number 1, 2002, pp. 5-37.
7. "The Doha squabble," *The Economist*, March 29, 2003, pp. 63-4.

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**

Vol. 2, número 3, 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

MICROORGANISMOS Y METALES PESADOS: UNA INTERACCIÓN EN BENEFICIO DEL MEDIO AMBIENTE

Recibido 30 de octubre de 2003/ Aceptado 12 de noviembre de 2003

Dra. Diana L. Vullo*



La acumulación de desechos, sobre todo en áreas urbanas, genera la dispersión de gran diversidad de compuestos en suelos, aguas superficiales y aire, con la consecuente filtración de los mismos hacia las aguas subterráneas: los acuíferos que constituyen la reserva de agua potable.

¿Cómo solucionamos el problema generado por la dispersión de contaminantes en el medio ambiente? La respuesta es lo que llamamos remediación. Para definir este término podemos decir que es el uso intencional de procesos de degradación químicos o biológicos para eliminar sustancias contaminantes ambientales que han sido vertidos con conocimiento o accidentalmente en el medio ambiente. Los procesos de remediación pueden efectuarse in situ, o sea en el mismo lugar donde ha ocurrido el derrame, o bien ex situ, separando la porción contaminada y trasladándola a un reactor. Tal es el caso de efluentes industriales o domiciliarios que se tratan previamente al vertido al medio ambiente.

Cuando escuchamos la radio, usamos una linterna, arrancamos el motor de nuestro automóvil, nunca pensamos que todos estos elementos contienen metales pesados. ¿Somos conscientes del destino que corren cuando se descarten? ¿Sabemos qué ocurre cuando tiramos apenas una pila a la basura? ¿Cuál es el destino de los metales pesados durante la fabricación de pilas y baterías y en otros procesos industriales?

Las actividades industriales generan una contaminación a gran escala con metales pesados (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au) y radionuclidos (U, Th) en el medio ambiente. En el caso particular de los suelos, suelen afectar la fertilidad y/o el uso posterior de los mismos, mientras que en el caso de los acuíferos y aguas superficiales, pueden comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para el consumo humano. La remediación de estos ambientes contaminados mediante la utilización de métodos químicos involucra procesos de costos excesivamente altos debido a la especificidad requerida. Además, este tipo de solución no es aplicable en procesos de remediación in situ, ya que es imposible tratar un metal determinado

debido a la competencia existente por la presencia de otros. La aplicación de métodos de remediación efectivos depende del conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del sitio, la solubilidad y especiación de los metales pesados, los procesos de atenuación e inmovilización y la medida en que los metales puedan dispersarse tanto horizontal como verticalmente a medida que migran por el suelo. Por otra parte, la utilización de métodos biológicos para remediar un ambiente contaminado (biorremediación) ofrece una alta especificidad en la remoción del metal de interés con flexibilidad operacional, tanto en sistemas in situ como ex situ.

IMPACTO AMBIENTAL

El impacto ambiental de los contaminantes metálicos en suelos y sedimentos es estrictamente dependiente de la capacidad de complejamiento de éstos con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno. Los metales son especies químicas no degradables. Por tal motivo, una vez volcados al medio ambiente, sólo pueden distribuirse entre los entornos aire - agua - suelo, a veces cambiando su estado de oxidación, o incorporarse a los seres vivos. Los procesos de adsorción y la formación de complejos en medios naturales son responsables de que la mayor parte de los vestigios de metales pesados se acumulen en los sólidos en suspensión, incorporándose rápidamente a los sedimentos, donde se presentan los mayores niveles de concentración de estos contaminantes. Como resultado de estas interacciones, los sedimentos juegan un papel muy importante en la regulación de la calidad del agua. Por su parte, las aguas intersticiales, en contacto directo con los sedimentos, actúan como fuente o sumidero de estos contaminantes y en ellas se observan concentraciones intermedias entre las aguas superficiales y los sedimentos (5, 11, 14, 16)

BIODISPONIBILIDAD

La toxicidad de los metales pesados es muy alta. Su acción directa sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos. Para que los metales pesados puedan ejercer su toxicidad sobre un ser vivo, éstos deben

encontrarse disponibles para ser captados por éste, es decir que el metal debe estar biodisponible. El concepto de biodisponibilidad se encuentra íntimamente relacionado con las condiciones físicoquímicas del ambiente, que determinan la especiación y por lo tanto la concentración de metal libre y lábil. Por ello es fundamental al determinar el grado de contaminación por metales pesados de un ambiente, conocer su biodisponibilidad, es decir, la concentración de metal libre y lábil presente en la muestra (3, 15, 17, 22, 24).

Los métodos electroquímicos permiten determinar la especiación de un metal y analizar la disponibilidad del mismo en diferentes ambientes. En particular la aplicación de las técnicas de Voltamperometría de Preconcentración (4, 8, 9) que permiten evaluar la existencia de complejos entre el metal y ligandos presentes en el medio ambiente natural y la labilidad de los mismos. Por medio de las curvas de intensidad de corriente registrada en una muestra en función del potencial aplicado a la misma, se evidencia la presencia de metales a través de la aparición de picos, cuyas áreas y alturas son proporcionales a las concentraciones de los mismos en estado libre en esas condiciones de lectura. Las Figuras 1.A., 1.B y 1.C (6) muestran una serie de voltamperogramas realizados en nuestro laboratorio de Electroquímica, para muestras naturales de aguas subterráneas (Figura 1.A), intersticiales (Figura 1.B) y superficiales (Figura 1.C), con y sin tratamiento de destrucción fotoquímica de materia orgánica de manera de eliminar todo ligando presente, en las cuales se evaluó la presencia de Cu, Cd, Pb y Zn.

Figura 1a

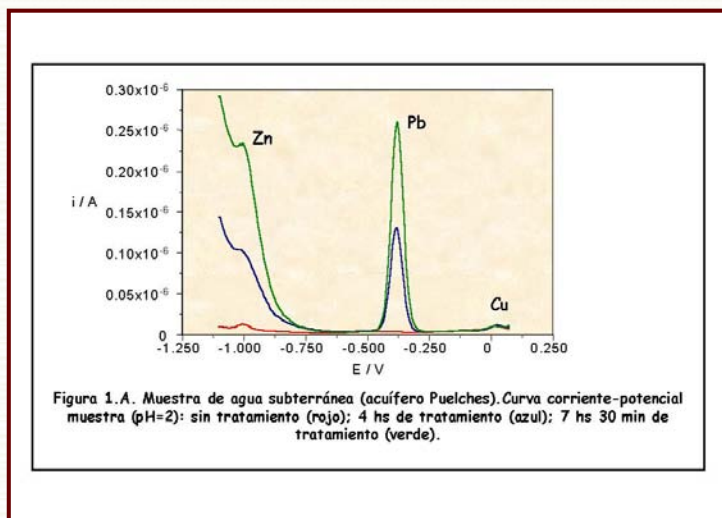


Figura 1b

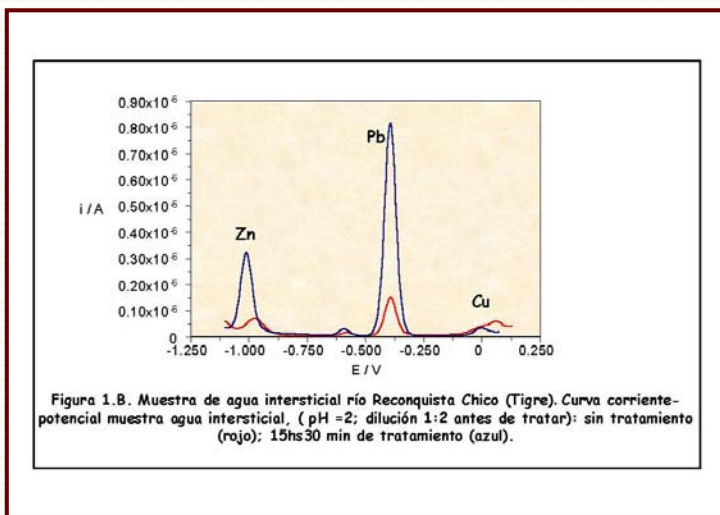
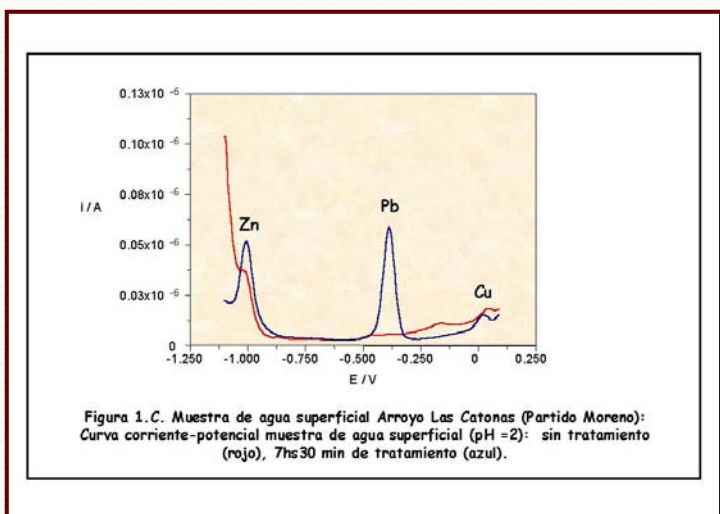


Figura 1c



Se ve claramente como cambia el perfil de las muestras antes y después de la destrucción de ligandos de origen orgánico, como consecuencia de la liberación de metales de sus complejos estables. Es decir que en toda muestra natural la concentración de metal total se halla alejada de la disponible y ese alejamiento se debe al complejamiento existente con los componentes naturales de la muestra.

TRANSFORMACIONES MEDIADAS POR MICROORGANISMOS

Todas las interacciones entre los microorganismos y los metales u otros elementos como carbono, nitrógeno, azufre y fósforo son componentes fundamentales del ciclos biogeoquímicos. Las interacciones metal-microbiota son estudiadas entonces en profundidad en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de

implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionúclidos (10, 20, 21, 30) .

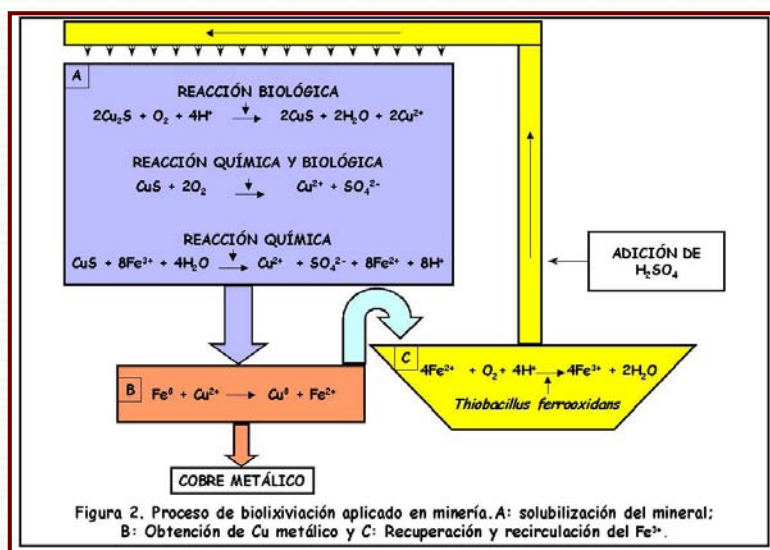
Dependiendo del estado de oxidación que se presente un metal y la especie que esté conformando, un microorganismo puede realizar dos transformaciones posibles. Una correspondería a la movilización del metal, es decir el pasaje de un estado insoluble inicial (metales asociados a suelos, sulfuros u óxidos metálicos, por ejemplo) correspondiente a una fase sólida, a un estado soluble final, en fase acuosa. Este proceso se conoce con el nombre de lixiviación microbiana. El otro corresponde a la inmovilización del metal, es decir el pasaje de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida. A su vez existen en la naturaleza diferentes mecanismos por los cuales la inmovilización del metal puede llegar a ocurrir. Veamos entonces un poco más en detalle estas interacciones metales pesados-microorganismos.

MOVILIZACIÓN DE LOS METALES PESADOS

Biolixiviación

Este mecanismo de solubilización es utilizado en la industria minera. Por intermedio de la acción microbiana, los metales presentes en los minerales resultan extraídos en fase acuosa. Tal es el caso de la obtención de Cu por la oxidación de las menas de Cu₂S (calcocita) a CuSO₄ por intermedio de la acción de las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans* [Figura 2, (23)].

Figura 2



Desde el punto de vista de la biorremediación, el biolixiviado puede utilizarse dentro de la perspectiva de la hidrometalurgia, recuperando metales a partir de materiales sólidos contaminados como suelos, cenizas

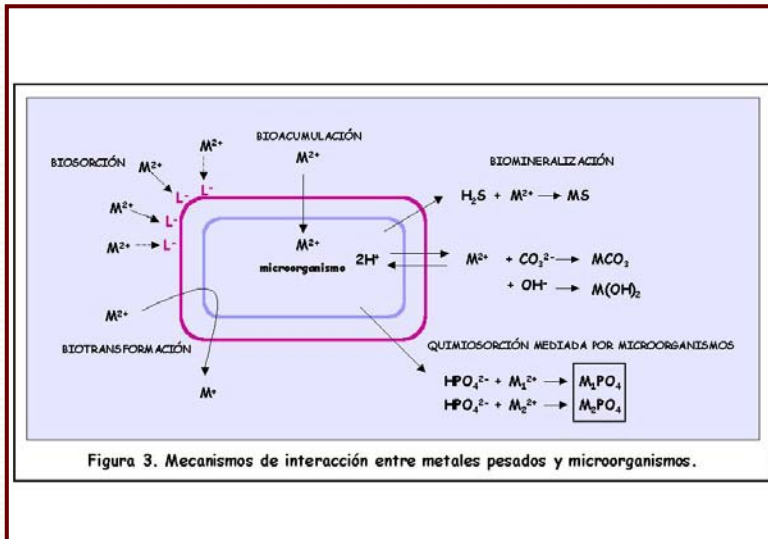
resultantes de quema de desechos, sedimentos acuáticos, etc. Este proceso se ha aplicado con éxito utilizando bacterias oxidadoras del hierro o sulfuros, como *Thiobacillus ferrooxidans* o *Thiobacillus thiooxidans*, respectivamente, en la recuperación de Cu, Ni, Zn y Cd, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, ya que estos microorganismos pueden utilizar el catión Fe^{3+} como último aceptor de electrones en lugar del O_2 (2). Las bacterias del género *Thiobacillus* son microorganismos acidófilos, es decir, requieren un pH = 2,5 para crecer en condiciones óptimas, lo cual resulta adecuado para mantener a los metales en solución, sobre todo al Fe^{3+} . Con valores de pH mayores a 5,5, estos microorganismos no se desarrollan, por lo tanto la lixiviación no sería efectiva. Pero como era de esperar, existen otros microorganismos en la naturaleza capaces de lograr una solubilización efectiva de metales tales como Mn, Fe, Zn, Cd y Pb a pH mayores a través un mecanismo diferente. Se ha comprobado que este mecanismo ocurre a través de la liberación de compuestos orgánicos capaces de complejar y así solubilizar metales, tales como ácidos carboxílicos o los compuestos llamados sideróforos (10, 20, 21). Algunos hongos como *Trichoderma harzianum* pueden solubilizar MnO_2 , Fe_2O_3 y Zn metálico mediante la liberación de agentes quelantes. *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) es una bacteria capaz de acumular metales pesados, previa solubilización de los mismos mediante la liberación de sideróforos. Los sideróforos son péptidos con capacidad complejante que son liberados al medio con el objeto de captar Fe, que es utilizado como oligoelemento dentro del metabolismo celular. La biosíntesis de sideróforos, si bien se induce en ausencia de Fe en el medio, también ocurre en presencia de otros metales, con el fin de detoxificar el entorno celular (7, 12, 31). Otro caso interesante resulta la utilización de una combinación de la solubilización microbiana del Pb de la piromorfita, $Pb_5(PO_4)_3Cl$, mediada por el hongo *Aspergillus niger* con la acumulación del metal disuelto por parte de plantas que crecen en suelos contaminados con dicho mineral (10). Este último fenómeno es conocido por fitorremediación, donde la retención del metal es mediada por la acumulación en vegetales.

INMOVILIZACIÓN DE METALES PESADOS

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal (27). En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos [Figura 3, (21)]. Estos fenómenos son: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y

quimiosorción mediada por microorganismos.

Figura 3



Biosorción

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre (13, 19, 28, 29). Los microorganismos utilizados como biosorbentes, aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales. Esto minimiza los costos en un proceso de remediación, ya que no requiere el agregado de nutrientes al sistema, al no requerir un metabolismo microbiano activo. La biomasa capaz de participar en estos procesos es fácilmente extraíble de sistemas acuosos como cursos de aguas o efluentes de diversos orígenes, por lo que el proceso global de biorremediación sería rentable. Es por ello que la búsqueda de este tipo de microorganismos se encuentra en crecimiento constante, junto con el estudio de sistemas biosorbentes como por ejemplo la utilización de consorcios microbianos, o sistemas mixtos formados por microorganismos y macromoléculas (polímeros) sorbentes, que incrementarían los rendimientos en la captación de mezclas de metales pesados (1, 18, 25, 33, 34).

Los fenómenos de biosorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción físicoquímica del metal con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares, como por ejemplo carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo. Es un mecanismo de cinética rápida que no presenta una alta dependencia con la temperatura y en muchos casos puede estudiarse en detalle mediante la construcción de los modelos de isothermas de Langmuir y Freundlich.

Bioacumulación

Este mecanismo celular involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema H⁺-ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos.

Algunos ejemplos de este proceso son muy interesantes, como el caso de acumulación de uranio por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccaromyces cerevisiae* (21).

Biomineralización

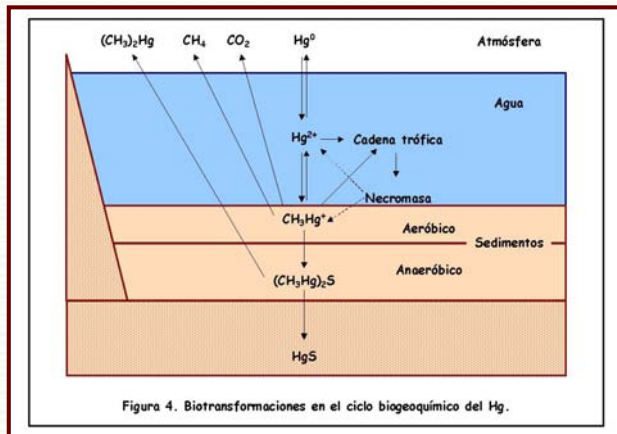
Los microorganismos son capaces de precipitar metales y radionuclidos como carbonatos e hidróxidos, mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos. Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H⁺ hacia el interior celular. Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado (Figura 3.).

Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad enzimática celular. Un ejemplo de ello es la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias reductoras de sulfato (10, 21) o la acumulación de CdS en la pared celular de las bacterias *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa* (26, 35).

Biotransformación

Este es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, como por ejemplo en el estado de oxidación o metilación. Esta transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles. El ejemplo más claro es el ciclo del Hg en la naturaleza, donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión Hg²⁺ a Hg⁰, y otros organismos pueden luego metilarlo dando como producto el CH₃Hg⁺ y (CH₃)₂Hg, que son volátiles y aún más tóxicos que el propio Hg (Figura 4.).

Figura 4



Las reducciones de V(V) a V(III), Au(III) a Au(0) y Cr(VI) a Cr(III), conducen a la precipitación del metal bajo condiciones fisiológicas. Entre estos últimos el Cr es el metal más ampliamente utilizado en la industria de aceros, automóviles, equipamiento de hospitales y curtiembres, entre otras. El Cr(VI) es un contaminante de prioridad 1 catalogado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA: www.epa.gov), ya que es estable en solución acuosa y por lo tanto de alta movilidad en diferentes ambientes, con un alto potencial mutagénico y carcinogénico. El pasaje a Cr(III) produce la inmovilización por precipitación de hidróxidos y la disminución en la mutagenicidad. La utilización de microorganismos resistentes a Cr con capacidad de bioconversión Cr(VI) en Cr(III) es de fundamental importancia en el tratamiento biológico de efluentes industriales (21, 28).

Quimiosorción mediada por microorganismos

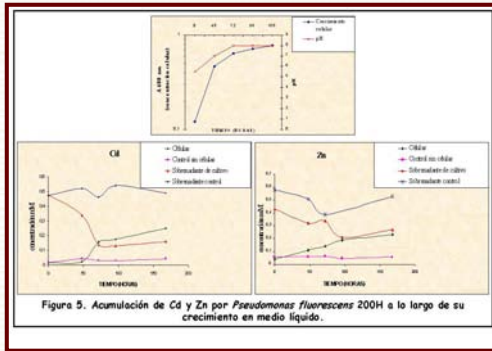
Dentro de este término se pueden describir aquella clase de reacciones en donde los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario. Este depósito primario funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización (Figura 3).

Un ejemplo de este proceso es el agregado de Fe en un efluente a tratar, en presencia de bacterias reductoras del sulfato. Estos microorganismos producen sulfuros que precipitan en forma de FeS, sobre la superficie celular. Los otros metales contaminantes utilizan el FeS formado como soporte y cristalizan sobre sus cristales. Luego, aprovechando las propiedades magnéticas del Fe, pueden separarse fácilmente de la fase soluble, decontaminando así el material (21).

Cualquiera de los mecanismos microbianos descritos remueve los metales pesados de efluentes contaminados. Los microorganismos autóctonos que sobreviven en sitios contaminados han desarrollado

mecanismos de resistencia y/o tolerancia que nos son útiles a la hora de la implementación de procesos de biorremediación. *Pseudomonas fluorescens* 200H, aislada en nuestro laboratorio a partir de aguas superficiales contaminadas del arroyo Las Catonas (Partido de Moreno, Buenos Aires) logra la separación de la fase acuosa del 65% de Cd y 32% de Zn presentes en el medio de cultivo (Figura 5).

Figura 5



Si bien la mayor parte de Cd y Zn aparece retenida en las fracciones correspondientes a pared celular, experimentos posteriores nos revelaron que el porcentaje de metal biosorbido es muy bajo, alrededor del 7%. Evidentemente existe la posibilidad de que ocurra una biomineralización del metal, la cual requiere un metabolismo celular activo, que tendremos que estudiar más a fondo. Éste es sólo un ejemplo. A diario realizamos nuevos aislamientos, con el objeto de reunir la mayor cantidad de microorganismos que en cultivos puros o mixtos logren una separación eficiente de los metales de nuestro estudio, Cu, Pb, Cd y Zn y con ellos diseñar sistemas de biorremediación ex situ de efluentes líquidos (32).

En conclusión, el rol de los microorganismos es fundamental en los ciclos biogeoquímicos de los metales y su utilización en los procesos de biorremediación de desechos sólidos y líquidos es esencial para el cuidado del medio ambiente.

* la autora es Jefe de Trabajos Prácticos del Área Microbiología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) y Profesora Adjunta del Área Química del Instituto de Ciencias de la Universidad Nacional de General Sarmiento (J.M. Gutiérrez 1150, B1613GSX, Los Polvorines, Provincia de Buenos Aires), integrante del proyecto de investigación en Química Ambiental: "Influencia de la capacidad complejante del medio en la remediación de aguas contaminadas con metales pesados mediante el empleo de microorganismos autóctonos". E-mail: dvullo@qb.fcen.uba.ar dvullo@ungs.edu.ar

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis compañeras de trabajo Lic. Helena Ceretti y Dra. Silvana Ramírez por su ayuda en la confección de este artículo.

Referencias

1. Bréant, D., Jézéquel, K., y Lebeau, T, 2002. Optimisation of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd²⁺: influence of Cd²⁺, inoculum size, culture medium and alginate beads characteristics. *Biotechnology Letters* 24: 1237-1241.
2. Brombacher, C., Bachofen, R., Brandl, H., 1998. Development of a Laboratory-Scale Leaching Plant for Metal Extraction from Fly Ash by *Thiobacillus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64(4): 1237-1241.
3. Brown, G.E. (Jr.), Foster, A.L. and Ostergren, J.D., 1999. Mineral surfaces and Bioavailability of Heavy Metals: A Molecular-scale Perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3388-3395.
4. Bruland, K.W., Rue, E.L., Donat, J., Skrabal, S.A., Moffet, J.W., 2000. Intercomparison of voltammetric techniques to determine the chemical speciation of dissolved copper in a coastal seawater sample. *Analytica Chimica Acta* 405: 99-113.
5. Buffle, J., Scott Altmann, R. Interpretation of Metal Complexation by heterogeneous Complexants en Aquatic Surface Chemistry: Chemical Processes at the Particle - Water Interface, 1987. Editado por W. Stumm. John Wiley & Sons.
6. Ceretti, H., Hughes, E., Ramírez, S., Vullo, D., Zalts, A. 2003. Sistema de irradiación uv de bajo costo para la fotodescomposición de materia orgánica en muestras de agua. VI Reunión Anual de SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Latinoamérica, 20 al 23 octubre, Buenos Aires, Argentina.
7. Clarke, S.E., Stuart, J., Sanders-Loehr, J, 1987. Induction of Siderophore Activity in *Anabaena* spp. and its Moderation of Copper Toxicity, *Applied and Environmental Microbiology* 53(5): 917-922.
8. Donat, J, 1994. Speciation of dissolved copper and nickel in South San Francisco Bay: a multi method approach. *Analytica Chimica Acta* 284:547-571.
9. Donat, J, Dryden, C., 2001. Transition metals and heavy metal speciation. *Encyclopedia of Ocean Sciences*, Academic Press.
10. Gadd, G.M., 2000. Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 271-279.
11. Hursthouse, A.S., 2001. The Relevance of Speciation in the Remediation of Soils and Sediments Contaminated by Metallic Elements-An Overview and Examples from Central Scotland, UK. *Journal of Environmental Monitoring* 3(1): 49-60.
12. Inoue, H., Takimura, O., Fuse, H., Murakami, K., Kamimura, K., Yamaoka, Y., 2000. Degradation of Triphenyltin by a Fluorescent *Pseudomonad*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8): 3492-3498.
13. Jianlong, W., Xinmin, Z., Decai, D., Ding, Z., 2001. Bioadsorption of lead (II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology* 87:273-277.

14. Kalbitz, K. and Wennrich, R., 1998. Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland spills and its dependence on dissolved organic matter. *The Science of the Total Environment* 209 : 27-39.
15. Kim, S., Ma, H., Allen, H. and Cha, D., 2002. Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: effect of complexation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 : 275-280.
16. Kretzschmar, H. and Sticher, H., 1997. Transport of humic-coated iron oxide colloids in a sandy soil: influence of Ca²⁺ and trace metals. *Environmental Science and Technology* 31: 3497-3504.
17. Krishnamurti, G.S.R. y Naidu, R., 2000. Speciation and phytoavailability of cadmium in selected surface soils of South Australia. *Australian Journal of Soil Research* 38(5), 991-1004.
18. Lebeau, T., Bagot, D., Jézéquel, K. y Fabre, B., 2002. Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. *The Science of the Total Environment* 291: 73-83.
19. Liu, Y., Xu, H., Yang, S., Tay, J., 2003. A general model for biosorption of Cd, Cu, and Zn by aerobic granules. *Journal of Biotechnology* 102:233-239.
20. Lloyd, J.R. and Lovley, D.R., 2001. Microbial detoxification of metals and radionuclides, *Current Opinion in Biotechnology* 12: 248-253.
21. Lovley, D.R., (ed.). *Environmental Microbe-Metal Interactions*, 2000, American Society for Microbiology, Washington D. C.
22. Lussier, S., Boothmen, W.S., Poucher, S., Champlin, D. and Helmstetten, A., 1999. Comparison of Dissolved and Total Metals Concentrations from Acute Tests with Saltwater Organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 : 889-898.
23. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. *Microbial Ecology en Brock, Biology of Microorganisms*, Ninth Edition, 2000, Prentice Hall, N.J., págs: 642-719.
24. Manson, R. and Lawrence, A., 1999. Concentration, Distribution, and Bioavailability of Mercury and Methylmercury in Sediments of Baltimore Harbor and Chesapeake Bay, Maryland, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 : 2438-2447.
25. McEldowney, S., 2000. The Impact of surface attachment on cadmium accumulation by *Pseudomonas fluorescens* H2. *FEMS Microbiology Ecology* 33:121-128.
26. Sharma, P.K., Balkwill, D.L., Frenkel, A. and Vairavamurthy, M.A., 2000. A new *Klebsiella planticola* Strain (Cd-1) Grows Anaerobically at High Cadmium Concentrations and Precipitates Cadmium Sulfide. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7): 3083-3087.
27. Silver, S. And Misra, T., 1988. Plasmid-mediated Heavy Metal Resistances. *Annual Reviews on Microbiology* 42: 717-43.

28. Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K., 2002. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* 48: 427-435.
29. Tangaromsuk, J., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., 2002. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Bioresource Technology* 85: 103-105.
30. Valls, M., de Lorenzo, V., 2002. Exploiting the genetic and the biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews* 26:327-338.
31. Visca, P., Colotti, G., Serino, L., Verzili, D., Orsi, N., Chiancone, E., 1992. Metal Regulation of Siderophore Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and Functional Effects of Siderophore-Metal Complexes. *Applied and Environmental Microbiology* 58(9): 2886-2893.
32. Vullo, D., Ceretti, H., Hughes, E., Ramírez, S., Zalts, A., 2003. Indigenous Heavy Metal Multiresistant Microbiota of Las Catonas Stream. *Environmental Monitoring and Assessment* (enviado para su publicación).
33. Vullo, D., Ceretti, H., Ramírez, S., Zalts, A., 2003. Retención de metales en gel de alginato de calcio. VI Reunión Anual de SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Latinoamérica, 20 al 23 octubre, Buenos Aires, Argentina.
34. Yakup Arica, M., Kacar, Y., Genc, O., 2001. Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-Alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from aqueous solution. *Bioresource Technology* 80:121-129.
35. Wang, C.L., Michels, P.C., Dawson, S.C., Kitisakkul, S., Baross, J.A., Keasling, J.D. and Clark, D.S., 1997. Cadmium Removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10): 4075-4078.

[Volver al número](#)

[Volver a la portada](#)

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**

Vol. 2, número 3, 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Una nueva visión del ARN: los ARN de interferencia. ¿Un nuevo genoma?

por Juan Carlos Calvo

Dr. en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Profesor Adjunto del Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA. Investigador Independiente, CONICET. Director del Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA

Recibido 28 de octubre de 2003/ Aceptado 20 de noviembre de 2003

Introducción.

Cuando la noticia acerca de la decodificación del genoma humano fue tapa de periódicos y revistas, tanto científicas como de divulgación, parecía que todo estaba terminado en lo que a la información genética se refería. Sin embargo, todavía quedaba mucho más por dilucidar, y esto también salió a la superficie gracias al Proyecto Genoma Humano.

Con apenas 30.000 – 40.000 genes no se podía explicar la inmensa variedad, que supera ese número, de proteínas celulares. Tampoco lo podía explicar, tal vez porque aún no se lo conoce en su totalidad, el proceso de “corte y empalme” alternativo que sufre el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en el núcleo de las células eucarióticas, antes de poder ser utilizado por los ribosomas para la síntesis proteica.

Resultaba evidente que la información genética debía ser más compleja y, por lo tanto, lo que faltaba en la explicación debería ser buscado en otra parte.

Y dónde si no en el “ADN basura”, esa porción mayoritaria de ácido

desoxirribonucleico para la que todavía no se había encontrado una función específica, más que la de asegurar la identidad genética de cada persona, tan de moda en estos días a través de los juicios criminales que son tapa de tantas revistas no científicas.

Y, como el que busca encuentra, se encontró ese “genoma oculto”, esa otra capa de información que promete ser, tal vez, incluso más importante que la conocida, porque podría ser la que controle la expresión de los genes “clásicos”.

La actividad científica se ha caracterizado siempre por su constante evolución, donde dogmas que parecían inalterables, como debiera ser todo dogma, debieron abrir paso a nuevos descubrimientos que los hacían menos rígidos. Tal el caso muy famoso de la oveja Dolly, quien rompió con el dogma de la imposibilidad de “desprogramar” una célula totalmente diferenciada.

Cada vez surge con más fuerza, esa frase de Ortega y Gasset que nos describe moldeados por nuestro “yo y las circunstancias”, sobre todo en el campo de la genómica, donde a los aspectos puramente genéticos se les suman los “epigenéticos” que, desde otro entorno, regulan y controlan su expresión. El ambiente influye, ciertamente, en la expresión de nuestros genes y, por lo tanto, es necesario mantener ese ambiente lo más puro y limpio que se pueda. Pero esto puede ser tema para otro artículo.

Hablemos un poco de esta otra capa de información, que llevará tal vez más tiempo para decodificar de lo que llevó el Proyecto Genoma Humano, porque se cuenta con menos elementos a partir de los cuales comenzar la investigación.

El dogma del flujo de información, desde su comienzo en los años 50, es relativamente simple: el ADN fabrica ARN, el ARN fabrica las proteínas y éstas son las que trabajan dentro y fuera de la célula. La información para este flujo se encuentra encerrada en la enroscada doble hélice de ADN. Un gen es una secuencia particular de cuatro bases químicas (A, T, C y G) encontrada en una de las dos cadenas, que contiene la información necesaria para sintetizar una proteína. Estas cuatro bases químicamente definidas se aparean en forma específica y universal, para mantener unidas las dos cadenas del ADN.

Con el mayor conocimiento de la actividad genética, se amplió la definición de

gen a la codificación de otras moléculas no proteicas, como ARNs que cumplen funciones tan variadas como estructurales o enzimáticas (ribozimas).

En los organismos superiores, tales como los humanos, estos genes aparecen fragmentados en trozos de secuencias codificantes, separadas por otras secuencias, a veces más extensas, que no codifican para proteínas. Esto se tomó como un indicio de complejidad, dado que las bacterias no presentan esta característica. Es un hecho que la porción de ADN con información para proteínas representa menos del 2% del total en los cromosomas humanos. Es decir que los 3.000.000.000 o más de pares de bases que todos llevamos en nuestras células, deben estar allí por alguna otra razón.

Por este motivo ya no se habla de genes, sino que se prefiere hablar de “unidades transcripcionales”, dado que no todos los genes serán traducidos a proteínas, sino que su producto quedará como moléculas de ARN de diversas características.

Cuando se comparan porciones de ADN entre distintas especies, se llega a la conclusión que más de 1.000 segmentos aparecen con cambios mínimos entre las mismas, indicando que estas secuencias podrían contribuir a la adecuación evolutiva de las mismas. Solamente unas 200 se encuentran dentro de las porciones de ADN codificantes para proteínas, dos tercios se encuentran en intrones (secuencias que separan a los exones, que son las porciones que integrarán al ARNm) y el resto se encuentra disperso en ese “ADN basura” que aparece entre los genes.

El ARN como actor principal en la nueva comedia genética.

Los investigadores han comenzado a prestar más atención a las moléculas de ARN y les encuentran cada vez más funciones.

La interacción vuelve a ser el centro de la escena: proteína-proteína, ARN-ARN, ARN-ADN, ARN-proteína, ARN-compuestos químicos pequeños. Los científicos han trasladado términos utilizados en otro contexto, al estudio de estas moléculas y, así, consideran a las proteínas como moléculas “analógicas”, mientras que el ARN sería una molécula “digital”, con secuencias específicas. Una molécula de ARN

podría “flotar” hasta encontrarse con una molécula complementaria de ADN o ARN y, entonces, interactuar formando una cadena doble. Una proteína interactúa con otra molécula, por complementariedad de estructura, más que de secuencia, en forma bastante parecida a como una llave encaja en la cerradura correspondiente.

Genes no convencionales.

Los genes, según la sabiduría “popular” son aquellas secciones de ADN que codifican para proteínas funcionales. Como ya dijimos, estas secuencias constituyen cerca del 2% del genoma humano. Sin embargo, el resto del genoma está lleno de ADN que es “no codificante” pero no por ello, “inservible”. Cada vez aparecen más “genes no codificantes” que, sin embargo, dan origen a ARNs activos, incluyendo variantes que pueden silenciar o regular a los genes “convencionales”.

Por ejemplo: si se transcribiese la hebra “codificante” de ADN, además de la que sirve como “molde” o “templado” en un gen, se sintetizaría una cadena de ARN que resultaría complementaria o “antisentido” del ARNm correspondiente. Estos ARNs “antisentido” podrían interceptar al ARNm transcrito a partir del gen correspondiente y, de este modo, impedir que aquel se traduzca en una proteína.

Los genes codificantes para proteínas, como dijimos, poseen secciones no codificantes llamadas intrones. Estas secuencias son eliminadas del transcripto inicial de ARN. Luego, las porciones codificantes se unen para generar el ARNm maduro. Aunque algunos intrones se degradan, otros poseen elementos activos que se convierten en “ARN de interferencia” (iARN), microARN que pueden controlar otros genes. Un intrón no degradado puede ser tomado por la maquinaria celular generadora de estos iARN y ser utilizado para bloquear ciertos ARNm en forma específica.

Otra forma de ARN también descubierta, son los conocidos como “ribo-interruptores” (“riboswitches”) que actúan como interruptores genéticos de precisión. En muchos casos son producidos por porciones de ADN no codificantes que se encuentran entre genes. Estos ribo-interruptores adoptan una conformación compleja, de manera tal que una parte de la molécula puede unirse a un blanco proteico o químico específico y la otra parte poseer el código en ARN para un producto proteico.

De esta manera, el ribo-interruptor se “enciende” y produce la proteína en cuestión, solamente si se encuentra presente su blanco. Estas moléculas de ARN, en su parte no codificante, son receptores muy sensibles para un blanco químico en particular. Una colisión con esta molécula activa al interruptor, causando un cambio conformacional en la otra punta de la molécula, que contiene un mapa clásico para el diseño de una proteína, tal como lo hace un gen clásico, pero que solamente se pone en funcionamiento cuando está presente la primera molécula en cuestión. Estos interruptores han sido encontrados en especies de todos los reinos vivientes. Tal vez representen el ancestro común más antiguo.

Un ejemplo de la importancia de ciertos tipos particulares de ARN, lo tenemos en la enfermedad conocida como “hipoplasia del cartílago piloso” (“CHH, cartilage hair hypoplasia”), una enfermedad recesiva identificada por primera vez entre la población Amish. Uno de cada 19 lleva una copia defectuosa del gen, que causa un tipo inusual de enanismo, en el que las personas no solamente son de estatura corta, sino que presentan alta propensión a cáncer y desórdenes inmunológicos. En el 2001 se identificó al culpable de esta enfermedad, un gen codificante solamente para ARN, llamado RMRP. El ARN transcrito por este gen es capaz de interactuar con proteínas para formar una enzima que altera la función mitocondrial. Un cambio en solamente una base de este ARN, puede significar la diferencia entre una vida sana, con estatura normal, o una vida breve (si es que se recibe la misma mutación de ambos padres) y con estatura corta.

Más acerca de los iARN.

El área del silenciamiento específico de genes ha sido motivo de múltiples estudios, no solamente por su biología interesante sino también por su potencial como herramienta experimental.

El fenómeno del ARN doble cadena como inductor del silenciamiento genómico se conoce desde hace varios años en plantas, como una forma de co-supresión (referido al silenciamiento de lugares, o loci, endógenos, siguiendo la introducción de transgenes. También se refiere al silenciamiento de lugares transgénicos de una manera que depende del número de copias) y también como una forma de silenciamiento genómico inducido por virus. Cuando, años más tarde,

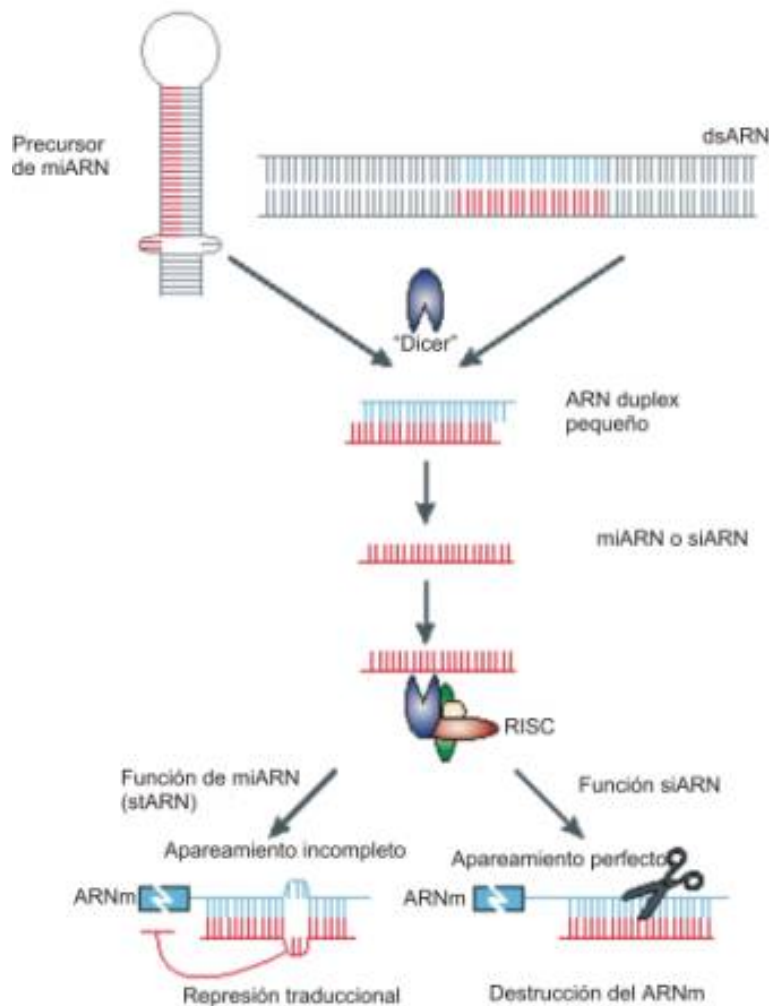
se descubrió un mecanismo similar en animales, se pensó en la utilización de ARN doble cadena como una herramienta muy poderosa en el campo del silenciamiento de genes.

Primero se descubrió que el ARN doble cadena era un silenciador más potente que cualquiera de las cadenas simples (ARN “sentido” o “antisentido”). A este fenómeno se lo llamó “interferencia por ARN” (iARN) para distinguirlo mecanísticamente de la supresión clásica mediada por ARN antisentido.

Uno de los primeros misterios en ser resuelto fue cómo el ARN doble cadena (dsARN), disparador del silenciamiento, proveía de especificidad a la maquinaria silenciadora. Un paso clave se dio al descubrir la formación de pequeños ARNs que resultaron complementarios al blanco a silenciar. El descubrimiento de estos ARNs pequeños llevó a los estudios bioquímicos de la actividad que los generaba.

Una familia de ribonucleasas, RNasa III, reconoce en forma específica ARN doble cadena, y fue la primera candidata para la actividad que generaba estos pequeños ARNs de interferencia (siARNs). En *Drosophila* se encontró una clase de enzimas RNasa III que era capaz de generar siARNs, a partir de dsARNs largos, en un proceso dependiente de ATP. Estas enzimas están conservadas evolutivamente en organismos competentes para iARN, y, en muchos casos, se ha demostrado una actividad bioquímica característica.

Para ejemplificar esto de manera más simple, podemos ver la figura que sigue:



El sistema de iARN (interferencia por ARN) es un mecanismo de defensa, aparentemente muy antiguo, contra ARN doble cadena extraños. ARNs de solamente 22 nucleótidos en longitud, llamados ARN de interferencia pequeños (siARNs), son cortados a partir de dsARN más largos por una enzima llamada “dicer”. La hebra antisentido del siARN es utilizada por un complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para guiar el clivaje de ARNm, promoviendo de esta forma la degradación del ARNm. Las abreviaturas utilizadas son: miARN, microARN, stARN, ARN pequeño temporario.

El proceso central que involucra al iARN es el corte de dsARN en pequeños trozos de una longitud definida por la enzima “dicer”. Esta enzima corta al dsARN en dos clases de ARNs pequeños: microARNs (miARNs) y ARNs pequeños de interferencia (iARNs), con una longitud aproximada de 21-23 nucleótidos. Aunque los microARNs también detienen la producción de proteínas, se piensa que los siARNs son los principales protagonistas en la interferencia por ARN. La enzima “dicer” entrega estos siARNs a un grupo de proteínas llamado el complejo silenciador

inducido por ARN (RISC), que utiliza la cadena antisentido del siARN para unirse al ARNm y degradarlo, resultando en el silenciamiento del gen. El sistema de interferencia por ARN es extremadamente eficiente, porque RISC es una enzima y cataliza múltiples vueltas de interferencia, tal vez cientos o miles *in vivo*.

Dado que la interferencia por ARN confía en la interacción específica entre secuencias del siARN y del ARNm, los siARNs pueden ser diseñados para silenciar casi a cualquier gen. La relativa facilidad con que los genes pueden ser silenciados mediante esta técnica, ha causado una revolución en la Biología Molecular. Utilizando los datos provenientes de la secuenciación de diversos genomas, el silenciamiento de genes por ARN puede ser utilizado en una escala alarmante.

Las posibilidades terapéuticas de esta técnica son enormes. Tomar la secuencia de ADN de un gen y diseñar dsARN que puedan silenciar en forma específica y efectiva un gen relacionado con una enfermedad, es análogo a la producción de anticuerpos monoclonales. El problema que se presenta es la posibilidad de estimular la respuesta de interferón, ante la presencia de dsARNs de 30 nucleótidos o más de longitud, en células de mamíferos. Pero esto ya ha sido solucionado por transfección directa del siARN.

Todavía quedan muchos misterios del sistema de interferencia por ARN que deben ser resueltos, pero una cosa es segura, y es que estos pequeños iARN han revolucionado la forma en que los científicos piensan acerca del ARN y cómo el ADN, el ARN y las proteínas son controlados y funcionan. El futuro dirá hacia dónde y qué utilidad se les dará dentro de las compañías farmacéuticas o la investigación científica.

Bibliografía consultada y sugerida:

-The unseen genome: gems among the junk. W. Wayt Gibbs en Scientific American, 28-33. November 2003.

-Non-coding RNA genes and the modern RNA world. Sean R. Eddy en Nature Reviews Genetics, Vol. 2, 919-929, December 2001.

-An expanding universe of noncoding RNAs. Gisela Storz en Science, Vol. 296, 1260-1263, May 17, 2002.

-Challenging the dogma : the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. John S. Mattick en BioEssays, Vol. 25, 930-939, October 2003

-RNAi: an ever-growing puzzle. Ahmet M. Denli and Gregory J. Hannon en TIBS, Vol. 28, 196-201, April 2003.

-RNA interference: the next genetics revolution? Safia Wasi en Understanding the RNAissance: <http://www.nature.com/horizon/rna/background.html>

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**

Vol. 2, número 3, 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Progestágenos y cáncer de mama: desarrollo de un modelo experimental

Claudia Lanari, Investigadora Independiente de CONICET y jefe del Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal del Instituto de Biología y Medicina Experimental.

Alfredo A. Molinolo, Investigador de Fundación Sales.

Buenos Aires- e-mail: clanari@dna.uba.ar

Recibido 11 de octubre de 2003/ Aceptado 28 de noviembre de 2003

El término genérico cáncer de mama se refiere a la proliferación neoplásica maligna originada en el compartimiento epitelial ya sea de estructuras ductales o lobulares de la glándula mamaria, siendo el más común, el carcinoma ductal. Este cáncer, según los informes de la Organización Mundial de la Salud constituye la neoplasia maligna más común en la mujer en el mundo occidental. Es la segunda causa de muerte por cáncer en Estados Unidos (1). Su incidencia es similar en Argentina y las tasas de mortalidad muestran un incremento sostenido.

Etiopatogenia/Factores de riesgo.

La mayoría de los factores epidemiológicos de riesgo del carcinoma mamario se asocian a una estimulación intensa y/o prolongada por hormonas sexuales femeninas. Dentro de los factores relacionados con hormonas podemos considerar los siguientes:

Historia menstrual y reproductiva; menarca temprana, menopausia tardía, preñez a término tardía y obesidad.

Lactancia: El riesgo se reduce en mujeres premenopáusicas que amamantan, pero no entre las posmenopáusicas con historia de lactancia (2).

Hormonas exógenas: los estrógenos exógenos, solos o combinados con progestágenos, elevan el riesgo de cáncer de mama (3). Para los progestágenos el riesgo relativo estimado fue 1.1 (95% IC, 0.99-1.2) para los contraceptivos orales y 1.09 (95% IC, 0.89-1.2) para los inyectables (4). El riesgo de cáncer de mama es mayor con el uso de progestágenos combinados con estrógenos, ya

sea en forma secuencial o continua, que con el uso de estrógenos solos (5). Con anticonceptivos, parece haber un aumento bajo entre las mujeres jóvenes con consumo prolongado (6). En un meta-análisis de datos provenientes de 51 estudios epidemiológicos de la relación entre riesgo de cáncer de mama y terapia de reemplazo estrogénico durante la menopausia se observó un riesgo aumentado con el uso de la terapia de reemplazo por más de 5 a 10 años (7). Con el fin de disminuir los efectos adversos de estrógenos en útero se comenzaron tratamientos combinados de estrógenos y medroxiprogesterona en la terapia hormonal de reemplazo. Los mismos tuvieron que suspenderse debido al aumento “inesperado” de carcinomas mamarios (8;9). Modelos de investigación.

1) Tumores inducidos por carcinógenos. Entre los varios modelos que se han desarrollado podemos mencionar los tumores inducidos por metilnitrosourea (MNU) y dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) en ratas, que son hormono-respondedores y expresan receptores de estrógenos (RE) (10;11). En ratones tanto el MNU (12;13) como el DMBA (14) inducen carcinomas mamarios en animales tratados con progestágenos aunque los tumores inducidos no son hormono-respondedores.

2) Tumores inducidos por la administración de hormonas. Hay muy pocos modelos en los cuales la administración de una hormona lleva a la aparición de carcinomas mamarios. Entre ellos podemos citar al modelo desarrollado en nuestro laboratorio usando progestágenos y al modelo de la cepa ACI de rata en la cual aparecen carcinomas mamarios por administración de estrógenos (15).

3) Tumores asociados a virus oncogénicos. Las cepas endocriadas de ratones como C3H, poseen alta incidencia de tumores mamarios, debido esencialmente a la presencia del retrovirus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus). Los tumores desarrollados por estas cepas suelen ser lobulillares y en general no expresan RE y de progesterona (RP), razón por la cual actualmente no se los considera un modelo óptimo para el estudio de los carcinomas mamarios humanos. Las cepas europeas como la GR, y la variante BALB/c recientemente generada en la Academia Nacional de Medicina (16) generan tumores que expresan RE y RP, pero, a diferencia de los humanos, son dependientes de preñez (17). El poliomavirus se ha utilizado para el desarrollo de carcinomas mamarios ductales en ratones adultos inmunosuprimidos o en neonatos normales (18).

4) Implantes tumorales humanos en animales de laboratorio. Para estos estudios se utilizan ratones atímicos o “nude” (nu/nu), para prevenir el rechazo de los tejidos tumorales humanos o de líneas celulares derivadas de tumores. Las condiciones de cría y cuidado de estos animales son extremadamente costosas.

5) Ratones genéticamente modificados. La investigación con animales transgénicos o knock-out (organismos con una supresión específica de un gen) permite una integración completa del órgano

en estudio y sus distintos tipos celulares con el status hormonal y fisiológico del animal. En los últimos quince años, su utilización en el estudio de cáncer de mama humano ha sido documentada en más de cien artículos (19). Podemos citar, entre otros, a ratones modificados en los oncogenes c-myc, v-Ha-ras, c-neu, wnt-1, los genes supresores de tumores p53, BRCA 1 y BRCA 2, y genes de la maquinaria celular como el gen de la ciclina D1. Para lograr especificidad tisular, algunos genes se encuentran bajo el control del promotor de MMTV. Es un excelente modelo in vivo, pero en muchos casos surgen tumores en otros tejidos, no se desarrollaron tumores de mama (como los ratones BRCA 1 +/- y BRCA 2 +/-) o los tumores generados resultaron morfológicamente distintos a los tumores de mama humanos (20).

6) Líneas celulares. Las líneas celulares son valiosos modelos a la hora de analizar ciertos aspectos de la biología celular del cáncer de mama. Sin embargo, células transformadas aisladas creciendo en un frasco de cultivo están sometidas a estímulos distintos a los de células in vivo y esto debe ser tenido en cuenta a la hora de la interpretación de los resultados y al extraer conclusiones. Carecen, entre otros factores, de una verdadera interacción epitelio, estroma y matriz, estructura tisular, respuesta inmune del huésped, exposición a hormonas y a factores ambientales, etc.; y, consecuentemente, pueden diferir del tumor que les dio origen. No obstante, la homogeneidad, reproducibilidad y manipulación ex profeso de las condiciones de cultivo hacen de las líneas celulares buenas herramientas de investigación.

Desde que Lasfargues desarrollara la primera línea celular humana de cáncer de mama en 1958 (21), se han establecido muchas líneas celulares. La línea celular de cáncer de mama por antonomasia es la MCF-7, desarrollada en 1973 a partir de un derrame pleural de un carcinoma de mama humano (22). Además de la MCF-7, las líneas celulares más utilizadas son la T-47D (23) y la ZR-75-1 (24). En los últimos años se han desarrollado nuevas líneas celulares, entre ellas se encuentran las recientemente desarrolladas por la Dra Isabel Lüthy (*Journal of Cell Physiol*, en prensa). Un problema vinculado a la investigación con las líneas celulares humanas inoculadas en ratones inmunosuprimidos es que no desarrollan metástasis, a diferencia de los xenotransplantes de tumores humanos (25).

Se han establecido pocas líneas celulares de ratón, la mayoría de las cuales no expresan RE y RP. Entre ellas, podemos citar a la línea BALB/c-MC (26) y MG1361 (27). En la Argentina se han establecido varias líneas celulares de ratón, como la LM3 y la LMM3 (28), la LM2 (29) y las desarrolladas en nuestro laboratorio que sí expresan receptores hormonales (30).

Inducción de carcinomas mamarios por MPA.

En el año 1985 desarrollamos el modelo de inducción de carcinomas mamarios murinos por MPA. Se inocularon ratones hembra BALB/c de dos meses de edad (Bioterio de la Academia Nacional de Medicina) cada tres meses con 40 mg de MPA de depósito (depot) sc en el flanco. Los ratones

desarrollaron carcinomas mamarios con una incidencia actuarial de 80% y una latencia de aparición de 52 semanas (31). Como rasgos llamativos de autopsia se observaron hiperplasias glándulo-quísticas y decíduomas uterinos e hipertrofia de las glándulas salivales. En estudios de montajes de glándulas mamarias completas se observaron distorsiones en la arquitectura y grosor de los conductos además de hiperplasia paraductal. Posteriormente en otro esquema de administración usando implantación de pellets de 40 mg con reposición a los seis meses, la incidencia de carcinomas mamarios también fue alta y de histología casi única ductal (32). Como se describirá más adelante, la misma cantidad de progesterona indujo también tumores de mama pero de histología lobulillar.

Receptores hormonales.

Se encontraron RE y RP en todos los carcinomas mamarios ductales (33;34), llegando a valores mayores de 1000 fmoles / mg de proteína para RP y valores de más de 500 fmoles / mg de proteína para RE. El valor de Kd para RP fue del rango de 5-7 nM y para RE: 0.8-10 nM. En todos los tumores estudiados se expresó receptor de prolactina con valores similares a los obtenidos de tumores provenientes de hembras BALB/c multíparas que se utilizaron como controles (Kd: 0.32 nM, rango: 6-27 fmoles / mg de proteína, n=7). Sólo se detectaron receptores de factor de crecimiento epidérmico (R-EGF) en muy bajas cantidades y en algunos casos no fue detectable. Estos receptores se expresaron altamente en tumores lobulillares mamarios también inducidos por MPA o en los tumores de hembras multíparas usadas como control. Posteriormente encontramos dos sitios receptores de RP por técnicas de unión al ligando, el clásicamente descrito y uno de muy alta afinidad y poca capacidad, ambos desplazables por antiprogestágenos (35).

Dependencia hormonal.

Los tumores se transplantaron con un trocar en el flanco derecho (s.c.) de hembras vírgenes BALB/c. Simultáneamente, los animales recibieron MPA (s.c.) depot (20 mg) en el flanco izquierdo. En todos los pasajes se dejó un animal sin tratamiento como control. Todos los adenocarcinomas mamarios ductales que expresaban receptores hormonales crecieron en ratones tratados con MPA y en los animales sin tratar sólo crecieron luego de dos meses de inoculado el tumor. Para el pasaje siguiente se utilizaron los tumores que crecían en los animales tratados con MPA (36). Los tumores crecieron muy lentamente luego de dos meses si eran transplantados en ratones sin MPA y luego de 6-8 meses en ratones ovariectomizados (ovx) (36). Los tumores no crecieron en animales ovx y adrenalectomizados (adx) (37). Por otro lado, los tumores crecieron luego de una

semana tanto en ratones tratados con MPA o Pg. El crecimiento tumoral se retrasó en animales ovx tratados con MPA comparado con animales tratados con MPA pero no ovx. Un tumor PD es definido como tal cuando crece en animales tratados con MPA y muy poco, seguido de regresión, en animales sin tratar durante los primeros dos meses de haber sido inoculado.

Modulación de la incidencia tumoral.

Se investigó la habilidad del MPA de inducir tumores mamarios en animales ovx y sialoadenectomizados (sdx) (sin glándulas salivales). Se observó una disminución significativa de la incidencia tumoral mamaria en ambos casos (34). Los tumores que crecieron, mostraron los mismos patrones histológicos y biológicos que los tumores inducidos en hembras intactas. Estudios histológicos mostraron que las glándulas mamarias eran hipoplásicas en animales ovx y sdx sugiriendo que las hormonas ováricas y el EGF de la glándula salival podrían favorecer la carcinogénesis inducida por MPA. El hecho de que la administración exógena de EGF aumentó la hiperplasia inducida por MPA en la glándula mamaria de ratones sdx sugiere que ambos factores podrían coactuar para inducir tumores mamarios (38). Se encontraron niveles altos de EGF sérico en animales tratados con MPA, mientras que niveles similares a los controles se encontraron en los animales sdx y tratados con MPA.

MPA en otras cepas de ratones.

Investigamos si el MPA es capaz de inducir tumores mamarios en otras cepas de ratones. Para esto utilizamos el mismo protocolo usado para inducir tumores mamarios en ratones BALB/c. Con la cepa C57/Bl el experimento no se pudo concluir debido a las ulceraciones en la piel observadas principalmente en los ratones tratados con MPA, pero que también se observaron en ratones controles mayores de 7-8 meses. Durante este período no aparecieron tumores mamarios. En el momento actual se están repitiendo estos experimentos no detectándose tumores luego de un año de tratamiento. En los ratones C3H, se observó un aumento de la incidencia tumoral en los ratones tratados con MPA, aunque marginalmente significativo, ya que en hembras no tratadas ya se observa una alta incidencia de tumores mamarios. Los tumores inducidos por MPA fueron histológica y biológicamente idénticos a los tumores espontáneos observados en esta cepa (36). Estos resultados sugieren que la cepa BALB/c es especialmente adecuada para estudiar carcinogénesis inducida por MPA.

Progesterona vs MPA.

La administración de Pg a ratones hembra BALB/c también indujo adenocarcinomas mamarios (32). La mayoría de los tumores fueron de tipo lobulillar precedidos por lesiones preneoplásicas lobulillares, morfológicamente diferentes de aquellos inducidos por MPA. Solo se observaron 2/9 tumores ductales mamarios.

Variantes hormono-independientes.

Ocasionalmente, algunos tumores PD comienzan a crecer en ratones no tratados. En estos casos, surge una nueva variante PI que es mantenida por trasplantes en ratones no tratados. Para continuar con la línea parental (PD) se utilizan células de pasajes anteriores. Los tumores progestágeno independientes (PI) ductales expresan, al igual que sus parentales, altos niveles de RE y RP y bajos niveles de R-EGF. En contraste a los tumores PI lobulillares que no expresan RE y RP pero sí tienen altos niveles de R-EGF. Los tumores ductales de crecimiento PI pueden ser inhibidos por E2, y/o antiprogestágenos mifepristona (RU 486) y onapristona (ZK 299) mientras que la flutamida (Flu, antiandrógeno) no altera el crecimiento tumoral. Estos resultados sugieren que los receptores esteroides aún siguen participando en el crecimiento tumoral PI. El tamoxifeno fue inhibitorio del crecimiento tumoral aunque no se observó regresión tumoral comparable a la de estrógenos o antiprogestágenos (39). El raloxifeno por otra parte no ejerció efectos inhibitorios del crecimiento tumoral. Existen sin embargo variantes que se vuelven resistentes al tratamiento hormonal y las llamamos tumores progestágeno independientes no respondedores (40).

Estudios de expresión de RP por Western blots (WB) e inmunohistoquímica.

Se demostró la presencia de ambas isoformas de RP, la A y la B, en todos los tumores PD y PI respondedores sin encontrarse diferencias algunas entre ambos tipos de tumores, y una banda inmunoreactiva de 78kDa también observada en carcinomas de mama humanos y de perros cuya función no se conoce. Bandas de peso molecular aproximado de 100 kDa compatibles con la observada por el grupo de Price (41) para RP de membrana también fueron observadas en muestras de extractos totales. Los tumores no respondedores por otro lado mostraron una significativa baja expresión de bandas. Sin embargo, por inmunohistoquímica usando tres anticuerpos diferentes todos los tumores mostraron alta expresión nuclear de RP (40).

Curiosamente tampoco encontramos diferencias en el WB cuando se estudian RP fosforilados en ser294. Todos son igualmente inmunoreactivos. Estos resultados sugieren que los tumores PD y PI respondedores no difieren en cuanto a la expresión de RP, en cambio los no respondedores tendrían RP modificados por lo cual son reconocidos por algunas técnicas y no por otras.

Resultados preliminares del laboratorio sugieren que siguen siendo funcionales, ya que el bloqueo de los mismos con técnicas “antisentido” inhibió la proliferación celular. Todos los tumores expresan RE alfa por WB sin determinar hasta ahora patrones de expresión en los distintos tumores. No se abordaron estudios de inmunohistoquímica para evaluar la presencia de receptores para glucocorticoides o de andrógenos. Los estudios de binding y de respuesta hormonal sugieren que no participarían en la proliferación celular.

Cultivos primarios.

Para evaluar la acción hormonal directa, se puso a punto una técnica para realizar cultivos primarios de una línea tumoral PD: C4-HD (42). Se obtuvieron cultivos enriquecidos de células epiteliales y de células estromales. Las células epiteliales se reinocularon en ratones BALB/c para evaluar la hormono-dependencia in vivo. Esta nueva línea se llamó CC4-HD y se observó un patrón de crecimiento similar entre las dos líneas tumorales. Pudimos demostrar que in vitro en las células epiteliales:

- a) El MPA estimuló el crecimiento sólo de células epiteliales (citoqueratina positivas). La máxima proliferación se observó tratando a las células con MPA 10 nM (42).
- b) Se obtuvo el mismo resultado tratando a las células con Pg (42).
- c) El crecimiento celular se estimuló con concentraciones 100 veces mayores de DHT y dexametasona que de MPA (42).
- d) E2 inhibió el crecimiento celular en concentraciones mayores de 0.1 nM (39;42).
- e) Tanto E2 como los antiestrógenos tamoxifeno e ICI 182.780 y los antiprogestágenos RU 486 y ZK 299 inhibieron la proliferación celular inducida por MPA (39;42;43).
- f) El raloxifeno por otra parte potenció la estimulación inducida por MPA (39).
- g) De los factores de crecimiento ensayados: EGF, IGF 1, IGF II, aFGF, bFGF y TGF β 1-3, sólo los FGFs indujeron efectos proliferativos en las células epiteliales mientras que los TGF β s fueron inhibitorios (38;43-45).
- h) Otros autores demostraron efectos proliferativos con Heregulina y TNF alpha (46).
- i) Tratamiento con oligonucleótidos antisentido de RP y antiprogestágenos inhiben la proliferación celular inducida tanto por progestágenos como por FGFs sugiriendo un cross talk entre ambas vías proliferativas. Esta inhibición es específica de las células tumorales (43).
- j) Tratamiento con oligonucleótidos antisentido de R-IGF 1 inhibe la proliferación celular (44) pero de manera no específica ya que el mismo efecto se observa en cultivos de fibroblastos estromales estimulados con factores de crecimiento como el EGF.

En cultivos de fibroblastos estromales se demostró que en condiciones experimentales de quiescencia, todos los factores de crecimiento mencionados anteriormente estimularon la proliferación celular. Por otro lado las hormonas esteroideas usadas o los antagonistas hormonales no afectaron la proliferación celular. Solamente el RU 486 ejerció pequeños efectos proliferativos,

posiblemente por su efecto antiglucocorticoide. El co-cultivo de células epiteliales y fibroblastoides produce un incremento notable en la proliferación celular. Los mecanismos asociados a esta interacción se están estudiando actualmente. Por otra parte cuando suero obtenido de ratones ovariectomizados y tratados con MPA se utilizó en los experimentos en lugar de suero fetal bovino, demostramos que factores séricos inducidos por MPA estaban potenciando el efecto proliferativo por MPA, sugiriendo que este progestágeno puede actuar junto con otros factores o haciendo a las células más sensibles a el MPA (43).

Desarrollo de líneas celulares.

Para completar un modelo experimental nos pareció de suma importancia desarrollar líneas celulares de nuestros tumores experimentales. En un principio el objetivo era tener líneas que se comportaran de manera similar a los cultivos primarios para poder manipular genes mediante transfecciones y otro tipo de herramientas moleculares. Hemos logrado desarrollar cinco líneas celulares a partir del tumor PD CC4-HD, llamadas MC4-L1 hasta MC4-L5 respectivamente y dos líneas derivadas del tumor PI respondedor C7-2-HI. Estas líneas representan las primeras desarrolladas en cáncer de mama murino que expresan receptores hormonales y por lo tanto pueden ser reguladas por hormonas. Cada línea presenta alguna particularidad. Pudimos observar que las líneas de morfología epitelioides son muy poco respondedoras in vitro a diferencia de las de morfología más fibroblastoide. Por otra parte in vivo el comportamiento es opuesto, las respondedoras in vitro no responden in vivo (30). Las líneas fibroblastoides son menos respondedoras al TGF β . Lo más llamativo resulta que los estrógenos, que eran las hormonas inhibitorias por excelencia, en nuestro modelo experimental estimulan el crecimiento in vitro. Los mecanismos de esta diferencia de respuesta no se conocen.

El modelo MPA como modelo experimental

Desde el punto de vista global este modelo tiene la ventaja que permite el estudio de los procesos de carcinogénesis de la glándula mamaria. Estos experimentos llevan mucho tiempo y deben realizarse con un número grande de animales pero tienen la ventaja que se evalúa la aparición de un tumor en el contexto de un organismo "enfermo". En este sentido cabe destacarse no sólo el efecto protector de la ovariectomía sino también el de la sialoadenectomía sobre la incidencia de carcinomas mamarios. El hecho de que los tumores son transplantables y progestágeno-dependientes pero que hayan dado origen a variantes hormono-independientes respondedoras o no al tratamiento hormonal permite por un lado el estudio de los mecanismos asociados a la respuesta proliferativa a hormonas y por otro lado el estudio de los mecanismos involucrados en la

transición a la autonomía y resistencia hormonal. Este es uno de los pocos modelos in vivo para este tipo de estudios que son de suma importancia dado que es la problemática más importante no resuelta en cáncer de mama humano.

La posibilidad de contar con cultivos primarios de estroma de los distintos tumores permite el abordaje del estudio de las relaciones parénquima-estroma tumoral.

Por último, si bien el objetivo de desarrollar líneas celulares con la misma respuesta hormonal que los tumores originales no fue lograda ya que en las líneas celulares las respuestas son diferentes, por ejemplo son estimulables por E2, nos hace replantear cómo habrán sido los tumores de las pacientes cuyas líneas celulares establecidas también son estimulables por E2. Además las líneas son muy útiles para estudios de mecanismos particulares y se están usando, como por ejemplo por el Dr Benard de Canadá, para el desarrollo de técnicas de tomografía para detectar metástasis a distancia usando moléculas fluoresceinadas que se unen a receptores estrogénicos.

Como modelo de cáncer humano creemos que este modelo reúne las características más importantes del cáncer humano: histología ductal, capacidad metastásica, transición por distintos estadios de hormono-dependencia, expresión de receptores hormonales, y respuesta al tamoxifeno.

Como enseñanza mayor nos deja la idea de que aún un tumor con p53 mutado (resultados no publicados) y sobre expresión de c-erbB2 (46), dos de los genes involucrados en cáncer de mama humano (y los únicos explorados) es capaz de desaparecer casi completamente si encontramos la llave apropiada, en este caso el receptor de progesterona. Por lo tanto el único camino plausible para controlar la enfermedad será el conocimiento de los mecanismos subyacentes en el control de la proliferación tisular.

Si se tiene en cuenta que recientemente dos estudios realizados en mujeres postmenopáusicas con terapia de reemplazo hormonal combinada revelaron un aumento de cáncer de mama en mujeres bajo tratamiento combinado con MPA, cuyos resultados muchos autores tienden a minimizar, algunos investigadores recomendaríamos la lectura del manual de la IARC de la última reunión científica en Lyon donde el MPA pasó de la categoría de no demostrada actividad carcinogénica a compuesto con demostrada actividad carcinogénica en animales de laboratorio (4).

Referencias

1. Seltzer V 2000 Cancer in women: prevention and early detection. J Womens Health Gend Based Med 9:483-488
2. Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Mittendorf R, Greenberg ER, Clapp RW, Burke KP, Willett WC, MacMahon B 1994 Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. N Engl J Med 330:81-87
3. Hulka BS, Liu ET, Lininger RA 1994 Steroid hormones and risk of breast cancer. Cancer 74:1111-

1124

4. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans - Hormonal Contraception and Post-menopausal Hormonal Therapy 1999 IARC Scientific Publications, World Health Organization, Lyon, France.

5. Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Egan KM, Trentham-Dietz A, Baron JA, Storer BE, Willett WC, Stampfer MJ 2002 Postmenopausal estrogen and progestin use in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:593-600

6. White E, Malone KE, Weiss NS, Daling JR 1994 Breast cancer among young U.S. women in relation to oral contraceptive use. *J Natl Cancer Inst* 86:505-514

7. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1997 *Lancet* 350:1047-1059

8. Women's Health Initiative 2002 Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321-333

9. Beral V 2003 Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362:419-427

10. Gullino PM, Pettigrew HM, Grantham FH 1975 N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *J Natl Cancer Inst* 54:401-414

11. Russo J, Tay LK, Russo IH 1982 Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2:5-73

12. Pazos P, Lanari C, Meiss R, Charreau EH, Pasqualini CD 1992 Mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and medroxyprogesterone acetate (MPA) in BALB/c mice. *Breast Cancer Res Treat* 20:133-138

13. Pazos P, Lanari C, Charreau EH, Molinolo AA 1998 Promoter effect of medroxyprogesterone

acetate (MPA) in N-methyl-N- nitrosourea (MNU) induced mammary tumors in BALB/c mice. *Carcinogenesis* 19:529-531

14. Aldaz CM, Liao QY, Paladugu A, Rehm S, Wang H 1996 Allelotypic and cytogenetic characterization of chemically induced mouse mammary tumors: high frequency of chromosome 4 loss of heterozygosity at advanced stages of progression. *Mol Carcinog* 17:126-133

15. Harvell DM, Strecker TE, Tochacek M, Xie B, Pennington KL, McComb RD, Roy SK, Shull JD 2000 Rat strain-specific actions of 17beta-estradiol in the mammary gland: correlation between estrogen-induced lobuloalveolar hyperplasia and susceptibility to estrogen-induced mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2779-2784

16. Buggiano V, Goldman A, Nepomnaschy I, Bekinschtein P, Berguer P, Lombardi G, Deroche A, Francisco MV, Piazzon I 1999 Characterization of two infectious mouse mammary tumour viruses: superantigenicity and tumorigenicity. *Scand J Immunol* 49:269-277

17. Pathology of tumours in laboratory animals. 1994 International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

18. Fluck MM, Haslam SZ 1996 Mammary tumors induced by polyomavirus. *Breast Cancer Res Treat* 39:45-56

19. Hennighausen L 2000 Mouse models for breast cancer. *Oncogene* 19:966-967

20. Cardiff RD 2001 Validity of mouse mammary tumour models for human breast cancer: comparative pathology. *Microsc Res Tech* 52:224-230

21. Lasfargues EY, Ozzello L 1958 Cultivation of Human Breast Carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 21:1131-1147

22. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M 1973 A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51:1409-1416

23. Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner HJ 1979 Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer*

15:659-670

24. Engel LW, Young NA, Tralka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Joyce MJ 1978 Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res* 38:3352-3364

25. Amundadottir LT, Merlino G, Dickson RB 1996 Transgenic mouse models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 39:119-135

26. Morimoto J, Imai S, Taniguchi Y, Tsubura Y, Hosick HL 1987 Establishment and characterization of a new murine mammary tumor cell line, BALB/c-MC. *In Vitro Cell Dev Biol* 23:755-758

27. Sacco MG, Gribaldo L, Barbieri O, Turchi G, Zucchi I, Collotta A, Bagnasco L, Barone D, Montagna C, Villa A, Marafante E, Vezzoni P 1998 Establishment and characterization of a new mammary adenocarcinoma cell line derived from MMTV neu transgenic mice. *Breast Cancer Res Treat* 47:171-180

28. Alonso DF, Farias EF, Urtreger A, Ladeda V, Vidal MC, Bal DKJ 1996 Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 62:288-297

29. Galli S, Colombo L, Daroqui MC, del C, V, Jasnis MA, Sacerdote dL, Eijan AM 2000 Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma. *Int J Oncol* 17:1259-1265

30. Lanari C, Luthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, Sanjuan N, Merani S, Molinolo AA 2001 Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Res* 61:293-302

31. Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD 1986 Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett* 33:215-223

32. Kordon EC, Molinolo AA, Pasqualini CD, Charreau EH, Pazos P, Dran G, Lanari C 1993 Progesterone induction of mammary carcinomas in BALB/c female mice. Correlation between progestin dependence and morphology. *Breast Cancer Res Treat* 28:29-39

33. Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD 1987 Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J Natl Cancer Inst* 79:1341-1350
34. Kordon EC, Guerra F, Molinolo AA, Charreau EH, Pasqualini CD, Pazos P, Dran G, Lanari C 1994 Effect of sialoadenectomy on medroxyprogesterone-acetate-induced mammary carcinogenesis in BALB/c mice. Correlation between histology and epidermal-growth-factor receptor content. *Int J Cancer* 59:196-203
35. Helguero LA, Lamb C, Molinolo AA, Lanari C 2003 Evidence for two progesterone receptor binding sites in murine mammary carcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84:9-14
36. Lanari C, Kordon E, Molinolo A, Pasqualini CD, Charreau EH 1989 Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int J Cancer* 43:845-850
37. Montecchia MF, Lamb C, Molinolo AA, Luthy IA, Pazos P, Charreau E, Vanzulli S, Lanari C 1999 Progesterone receptor involvement in independent tumor growth in MPA-induced murine mammary adenocarcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68:11-21
38. Molinolo A, Simian M, Vanzulli S, Pazos P, Lamb C, Lanari C 1998 Involvement of EGF in medroxyprogesterone acetate (MPA)-induced mammary gland hyperplasia and its role in MPA-induced mammary tumors in BALB/c mice. *Cancer Lett* 126:49-57
39. Lamb CA, Helguero LA, Fabris V, Lucas C, Molinolo AA, Lanari C 2003 Differential effects of raloxifene, tamoxifen and fulvestrant on a murine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 79:25-35
40. Helguero LA, Viegas M, Asaithamby A, Shyamala G, Lanari C, Molinolo AA 2003 Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. *Breast Cancer Res Treat* 79:379-390
41. Welter BH, Hansen EL, Saner KJ, Wei Y, Price TM 2003 Membrane-bound progesterone receptor expression in human aortic endothelial cells. *J Histochem Cytochem* 51:1049-1055

42. Dran G, Luthy IA, Molinolo AA, Charreau EH, Pasqualini CD, Lanari C 1995 Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 35:173-186
43. Lamb C, Simian M, Molinolo A, Pazos P, Lanari C 1999 Regulation of cell growth of a progestin-dependent murine mammary carcinoma in vitro: progesterone receptor involvement in serum or growth factor-induced cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70:133-142
44. Elizalde PV, Lanari C, Molinolo AA, Guerra FK, Balana ME, Simian M, Iribarren AM, Charreau EH 1998 Involvement of insulin-like growth factors-I and -II and their receptors in medroxyprogesterone acetate-induced growth of mouse mammary adenocarcinomas. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:305-317
45. Viegas MH, Salatino M, Goin M, Peters G, Labriola L, Costa dc, Lanari C, Charreau EH, Elizalde PV 1999 Differential expression of and responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in hormone-dependent and independent lines of mouse mammary tumors. *Cancer Detect Prev* 23:375-386
46. Balana ME, Lupu R, Labriola L, Charreau EH, Elizalde PV 1999 Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. *Oncogene* 18:6370-6379

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**

Vol. 2, número 3, 2003

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
