

Entrevista a Diego Golombek

“Contar la ciencia, sin perder rigor ni agregar solemnidad, es de lo más entretenido”

Por Susana Gallardo y Julia Pettinari

28/06/05

Es doctor en Ciencias Biológicas (UBA), Profesor Titular de la Universidad Nacional de Quilmes, Investigador Independiente del CONICET. Se especializa en cronobiología, y ha publicado numerosos trabajos científicos, así como libros de ciencia y de divulgación científica (entre otras actividades de difusión de la ciencia). En 2003 obtuvo el Premio Nacional “Bernardo Houssay” de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Nación. Dirige la colección de libros “Ciencia que ladra” y desde hace unos dos años participa en el programa “Científicos industria argentina”, donde representa al personaje de cocinero científico.



Fotos: Juan Pablo Vittori, Gentileza de revista *Exactamente*

QV: En tu casa, ¿sos el que cocina?

DG: Era... pero la vida me engañó y entre tanto trabajo y mucho de hijito, la verdad es que últimamente no me dedico tanto. Pero me fascina.

QV: ¿Qué tarea te brinda más satisfacciones: la investigación o la divulgación?

DG: No las veo disociadas. En mi caso la actividad principal es sin duda la investigación (y la docencia); creo que sin esa pata no podría hacer el resto; además, por alguna razón me parece que perdería mucha credibilidad (¡al menos la mía propia!). Disfruto ambas muchísimo: descubrir nuevos hallazgos y discutirlos con mis estudiantes es realmente fantástico y, por otro lado, encontrar la forma de contar la ciencia, sin perder rigor ni agregar solemnidad, es de lo más entretenido.

QV: ¿Como surge en vos la tarea de divulgador?

DG: Trabajo en periodismo desde hace muchos años, desde que a los quince respondí a un aviso en el Buenos Aires Herald en el que pedían un cronista de deportes. Allí iba a interminables partidos de cricket y otras maravillas – de ahí me queda un gusto por las redacciones, los cables, las Olivetti. Al meterme en una carrera científica pude explotar esta veta de escribiente y redirigirla hacia la difusión de la ciencia, como colaborador de diversos medios y aprendiendo mucho de varios maestros.

QV: ¿Cómo compatibilizás la investigación con esta tarea?

DG: No es fácil, por varias razones. La primera es el tiempo: la investigación será de dedicación completa o no será nada... Pero encuentro huecos y noches en los que meter la cuchara de divulgador. En muchos sentidos es una gran ventaja: al ir a hacer una entrevista creo que es importante hablar el mismo idioma que el interlocutor y poder llevar la charla a terrenos interesantes y comprensibles.

QV: ¿A qué público te dirigís, en general? Es decir, ¿cómo imaginás a tu destinatario potencial?

DG: Sabrán disculpar una cita de Borges: “escribo para mí, para mis amigos y para mitigar el paso del tiempo”... Y así es: salvo que sea por un encargo específico (una revista para chicos – aclaro que en alguna época hice la página de ciencia de Antejito -, algo más tecnológico, etc.), imagino a lectores y público con ganas de maravillarse, de hacerse preguntas, de querer saber. No siempre sale, pero la buena divulgación no tiene edad: a partir de una educación común, cualquiera puede subirse al tren.

QV: A partir de los ciclos de charlas y conferencias que has organizado, ¿tenés alguna percepción acerca del tipo de público que asiste, su formación y sus intereses?

DG: Es muy variado. Por un lado, cada actividad tiene un público específico que se acerca porque le interesa el tema particular que se trate. Hay también gente con interés en la ciencia en general, de cualquier edad (aunque noto muchos viejitos que se acercan con todas las ganas). Hay, y esto es de lo más interesante, muchos adolescentes que andan buscando su destino, y encuentran en este acercamiento a la ciencia un camino que a veces los seduce.

QV: ¿Cómo es la experiencia de la divulgación científica en la televisión?

DG: Maravillosa, sobre todo por la llegada a tanta gente. El programa “Científicos...” es muy popular; lo conoce todo el mundo, más allá del número de personas que lo miren (dato que en este momento no tengo). Eso tiene muchísimo que ver con Adrián Paenza, el conductor ideal de una iniciativa de este tipo. Confieso que, si bien ya había participado de otros programas de ciencia en la tele, tenía un cierto prejuicio acerca del medio, pero con Adrián y Claudio Martínez (el productor del ciclo) la verdad es que todo se ha hecho muy grato y sencillo. Por otro lado, la impresión que me da es que está todo por hacerse con la ciencia en la tele; no es necesario irse hasta el *Discovery Channel* o similares; tenemos mucho que decir por estos pagos también. En este momento estoy comenzando a planear nuevos proyectos de divulgación científica televisiva.

QV: ¿Hay algún feedback?

DG: ¡Muchísimo! Desde los 15 minutos de fama (gente que te para en la calle o –peor aun– llama a mi casa para hablar del programa o “darle un mensaje al profesor Paenza”) hasta la repercusión genuina de muchos espectadores que escriben o nos llaman con preguntas que les surgieron, necesidades de información y ganas de saber más.

QV: ¿Qué ventajas y desventajas ofrecen los diferentes canales de divulgación de la ciencia (medios gráficos, televisión, charlas ofrecidas por los mismos investigadores)?

DG: La televisión tiene la ventaja de la masividad y, si se basa en la actividad de los investigadores, puede tener una sustentación realmente importante. El problema es que es un medio con un alto nivel de comercialización y supongo que, a veces, habrá que hacer concesiones al respecto. Como escribiente, es obvio que los medios gráficos me atraen mucho, los medios serán diferentes, pero el fin no deja de ser perseguir la literatura. Con los diarios está el “problema” de que todo debe ser transformado en noticias para que pueda ser publicado, pero convengamos en que los medios locales están comenzado a ingeniárselas bastante bien. Siempre está el problema de la tergiversación de lo que diga un entrevistado (que ocurre más a menudo de lo que quisiéramos) pero creo que vamos por el buen camino a juzgar por la creciente preparación de los periodistas. Las charlas ofrecidas por los investigadores son un camino directo, sin intermediarios, y son irremplazables. Tal vez su único defecto sea que tenemos muy pocas de estas charlas (entre otras cosas porque no se consideran parte de la actividad científica y, entonces, no son suficientemente valoradas por los investigadores).

QV: ¿Cómo te parece que la sociedad ve a la ciencia en la actualidad?

DG: Como siempre: como una curiosidad en una vitrina, con gente simpática que se dedica a cosas relativamente inútiles, salvo cuando descubren algún bien de aplicación directa. También hay mucha conciencia de la brecha con otras sociedades que obtienen de la ciencia gran provecho.



QV: ¿Y a la ciencia argentina en particular?

DG: Como un ejemplo de martirología. Sin embargo, hay que admitir que la apertura de la mayoría de los científicos hacia la sociedad y el auge del periodismo científico están haciendo grandes progresos en este sentido.

QV: ¿Hay un consenso en la necesidad invertir en ciencia, o te parece que la gente ve al científico como algo decorativo que no influye para nada en el desarrollo del país?

DG: A juzgar por las encuestas de percepción pública de la ciencia y la tecnología, todo el mundo está de acuerdo en que hay que invertir en estas actividades. Sin embargo, sospecho que no queda muy claro de qué se trata.

QV: ¿Creés que la difusión de la investigación científica hacia el público en general puede contribuir a mejorar la situación actual de la ciencia en nuestro país?

DG: Por supuesto, pero no solamente por la difusión de los hallazgos en sí, sino por la “ciencia” como forma racional de mirar, comprender y actuar sobre el mundo.

QV: ¿Cómo ves la relación entre los investigadores científicos y la sociedad? ¿Creés que los investigadores deberían dedicar parte de su tiempo a difundir su tarea o es mejor que haya gente especializada en establecer el nexo?

Ambas cosas: estamos todos tan saturados de cosas y escasos de tiempos que se hace necesaria la figura del divulgador profesional que realmente entienda de qué se trata y trabaje en conjunto con los investigadores para difundir estas ideas. Eso no quita la enorme responsabilidad de los mismos investigadores en dedicar una parte de su cabeza y de su tiempo a participar de actividades de difusión.

QV: En la eterna discusión acerca de quiénes están mejor preparados para la divulgación, quienes tienen formación científica o los comunicadores, ¿cuál es tu posición?

DG: Sin duda tenemos que apuntar a un mutante híbrido. Creo que una persona con formación científica pero con genuino interés en la literatura y en la comunicación es el divulgador ideal. La formación científica (en esos términos de hacerse preguntas, pedir experimentos, ser un poco impertinente) es imprescindible para entender y para comunicar la ciencia. En muchos lugares se ofrecen estadias de periodistas en ámbitos de investigación como para que se empapen del asunto.

QV: ¿Te parece que la tarea del divulgador es apreciada y/o estimulada en el ambiente científico?

DG: Más o menos. Todo investigador tiene su ego y le gusta que le hagan una entrevista o salir en la tele (¡no le crean a quien diga lo contrario!). Pero a la hora de evaluar las actividades de divulgación el

dictamen no es sólo que no tiene mucho valor sino que, por el contrario, son contraproducentes para la investigación.

QV: Qué opinión te merece la obligatoriedad de publicar en inglés que es demandada por los organismos académicos?

DG: Mucho más allá de cuestiones ideológicas que han llevado a que sea justamente el inglés, no cabe duda de que la ciencia necesita de una *lingua franca* para una comprensión más o menos universal. Estoy muy de acuerdo en que así sea.

QV: ¿Se debería defender el español como lengua de la ciencia, fomentando la creación de publicaciones de alto nivel y con impacto, que estén en español?

DG: No me parece necesario. El uso del inglés es un hecho que no va a ser cambiado muy fácilmente y creo que en este caso conviene seguir la corriente.

QV: ¿Tenés alguna posición tomada respecto de temas prioritarios de investigación en términos de demandas o necesidades sociales?

DG: Sí, que son necesarios. El problema es encontrar un buen balance entre el financiamiento a los llamados “temas libres” (en general de investigación básica), que es absolutamente necesaria, y a los relacionados con demandas sociales.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 4, septiembre 2005

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Medicamentos para el estilo de vida (y para el debate)

Dra. Claudia Pérez Leiros*

Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pabellón 2, piso 4, C1428EGA,
Capital Federal, Argentina.
cpleiros@qb.fcen.uba.ar

Recibido: 21/8/05

Aceptado: 30/8/05

El límite entre salud y bienestar, entre necesidades y deseos, entre pacientes y consumidores, parece ser la clave para comprender la diferencia entre un medicamento a secas y un “medicamento para el estilo de vida”.

La expresión “estilo de vida” suele asociarse con categorías tan variadas como: hábitos y relaciones sociales, preferencias estéticas y culturales, ocupaciones y profesiones, formas de esparcimiento, entre otras. En general, los estilos de vida también se pueden relacionar con costumbres y tendencias en el consumo. Incluso, en los últimos años se ha establecido un vínculo entre estilos de vida –en un sentido más amplio habría que hablar de condiciones de vida- y la propensión a padecer ciertas enfermedades. Sin embargo, esta expresión nunca había estado ligada directamente a la farmacología hasta la década del '90 cuando empezaron a aparecer publicaciones académicas y no académicas sobre el uso creciente de algunos fármacos -conocidos en inglés como *Lifestyle drugs*- que se emplean para satisfacer o atender requerimientos del estilo de vida.

Baste con ir a la peluquería, participar en una cena entre amigos o -vianda en mano- escuchar las charlas en los comedores de las oficinas y otros lugares de trabajo, para identificar a un buen número de estas drogas y sus nuevas indicaciones. Sin embargo, no parece tan sencillo llegar a un acuerdo para usar la palabra “medicamentos” si no se menciona la palabra “enfermedad”. Por otro lado, cuando se trata de drogas asociadas al estilo de vida, parecen más adecuadas las expresiones “usar” o “consumir” tal producto, como si fuera un alimento o un cosmético, que “tomar tal medicamento”, que suele relacionarse con una prescripción médica. Y siguiendo con este cruce del lenguaje coloquial y el farmacológico, probablemente nos encontremos con otra distorsión entre dos categorías de individuos aparentemente diferentes a la hora de ingresar una píldora en su boca: los pacientes y los consumidores.

Una de las definiciones más precisas y convocantes de los llamados “medicamentos para el estilo de vida” fue propuesta por David Gilbert, alto funcionario del *Office for Public Management* de Londres; Tom Walley, profesor de farmacología clínica en la Universidad de Liverpool, y Bill New, analista independiente de política sanitaria residente en Londres. Según ellos, las drogas para el estilo de vida (*Lifestyle drugs*) son aquellas que se usan para tratar problemas que no son de salud o para tratar condiciones en el límite entre la necesidad de mantener la salud y la satisfacción de deseos asociados al estilo de vida y al bienestar general (1). Una definición más



amplia -proponen los autores- incluiría en este grupo a las drogas que se usan para tratar problemas de salud que podrían ser resueltos más adecuadamente mediante un cambio en el estilo de vida. Con esta definición, el grupo de drogas para el estilo de vida se extendería para incluir a otros medicamentos como, por ejemplo, los inhibidores de las bombas de protones (hidrógeno catiónico) que se emplean en el tratamiento de las úlceras gástricas.

A modo de “*lifestyle vademécum*”

Entre los ejemplos más citados de drogas asociadas al estilo de vida están el sildenafil, nombre genérico del medicamento aprobado en 1998 para tratar la disfunción eréctil en el hombre, conocido comercialmente como VIAGRA®; el minoxidil, originalmente indicado como antihipertensivo que se usa para el tratamiento de la calvicie, y el orlistat, para el tratamiento de la obesidad.



El caso del VIAGRA® es emblemático porque es uno de los medicamentos más recientes en esta lista y fue uno de los que más rápidamente se aprobó en los distintos países, una vez cumplidas las etapas del ensayo clínico en los Estados Unidos y autorizado por la FDA (*Food and Drug Administration*, agencia sanitaria de los Estados Unidos). Por ejemplo en Japón, mientras que las píldoras anticonceptivas requirieron más de 30 años para ser aprobadas por las autoridades sanitarias, la autorización para comercializar el sildenafil sólo necesitó seis meses. Aunque esta rapidez dio lugar a muchas conjeturas sobre una sociedad machista, no se puede soslayar el hecho de que, en ese momento, las autoridades sanitarias, académicos y empresarios de los laboratorios farmacéuticos de Japón, Estados Unidos y la Comunidad Europea acababan de aprobar tras ocho años de trabajo, las normas ICH (*International Conference on*

Harmonisation). Esta normativa -que se encuentra disponible como 37 guías en el sitio *web* de la FDA- rige actualmente en esos países para el desarrollo de nuevos fármacos y tiene como objetivo alinear características comunes de los fármacos y diferencias poblacionales (*bridging studies*) con el fin de acelerar algunas etapas y facilitar la aprobación de nuevos medicamentos, una vez que éstos han sido aprobados en alguno de los países miembros (2).

El VIAGRA® constituye uno de los “golazos” terapéuticos de los últimos años por ser una droga dirigida a un blanco farmacológico nuevo. En efecto, la isoforma V de la enzima fosfodiesterasa de GMPc localizada principalmente en el músculo liso y endotelio de algunos tejidos, es el blanco molecular del sildenafil y no se conocía como posible sitio de acción de drogas. La inhibición de esta enzima por el sildenafil impide la degradación del GMPc y así mantiene la erección. Basados en el mecanismo de acción y en sus indicaciones terapéuticas, se puede deducir que los usos del VIAGRA® en hombres sanos o en mujeres, tienen más relación con una búsqueda de satisfacción que con la necesidad de un medicamento.



El minoxidil es otro caso interesante por la amplificación y diversificación en las ventas que ha conseguido al pasar de ser un medicamento para controlar la presión arterial a un producto que evita la caída del cabello con un perfil de consumo como cosmético. El sulfato de minoxidil activa los canales de potasio regulados por el ATP que, al abrirse, conducen a una hiperpolarización de las células del músculo liso vascular con vasodilatación y reducción de la presión arterial. La hipertricosis, aumento del crecimiento del cabello, por tratamiento prolongado con minoxidil fue descripta

inicialmente como un efecto adverso causado por el mismo mecanismo de acción y luego dio lugar a la producción de formas farmacéuticas como lociones de uso tópico.

Si aceptamos que muchas sustancias o drogas que causan efectos en el organismo no cumplen estrictamente la definición de “medicamento”, es decir, no tienen implícito un beneficio terapéutico, la cantidad y variedad de drogas asociadas al estilo de vida se hace mucho más amplia y los tres ejemplos mencionados antes son sólo el encabezamiento de una larga lista en continuo crecimiento (cuadro 1, modificado de ref. 3).

Como se puede ver en el cuadro, algunas características comunes permiten separar las drogas para el estilo de vida en distintas categorías, por ejemplo, aquellas que fueron aprobadas para un uso que luego se ha extendido para satisfacer deseos relacionados con hábitos sociales (primer grupo) o las que -una vez aprobadas para una indicación terapéutica- mostraron una aplicación distinta con fines estéticos o de rendimiento físico (segundo grupo). Asimismo, se puede diferenciar a las drogas que cumplen con la definición de “droga para el estilo de vida” pero tienen poca (el alcohol, la cafeína o la marihuana) o ninguna (MDMA o éxtasis, cocaína) utilidad clínica. Finalmente, una marcha sin prisa pero sin pausa desde tiempos remotos y con mucha prensa en la actualidad es la que han protagonizado los productos naturales reconocidos por efectos tan diversos y abarcadores como el de suplemento nutricional, efecto antioxidante, digestivo, hipnótico, etc., la mayoría comercializados bajo el manto confortable de una supuesta inocuidad (quinto grupo).

Cuadro 1: Medicamentos para el estilo de vida

Características generales	Ejemplos	Indicación original para la cual fue aprobada	Otros usos como drogas asociadas a un estilo de vida
Aprobadas para un uso que luego se extendió para satisfacer otros deseos o necesidades asociadas al estilo de vida	Orlistat	Tratamiento de obesidad	Pérdida de peso
	Sibutramina	Anorexígeno	Pérdida de peso
	Anticonceptivos orales	Prevención de embarazo	Prevención de embarazo
	Sildenafil	Disfunción eréctil	Disfunción sexual, otros
	Metadona	Tratamiento de adictos a opioides	Sustituto de morfina
	Bupropion	Tratamiento de adictos a nicotina	Dejar de fumar
Aprobadas para una indicación y usadas luego con fines estéticos o de rendimiento	Minoxidil	Hipertensión	Crecimiento del cabello
	Eritropoyetina	Anemias crónicas	Mayor rendimiento físico
Cumplen con la definición de droga social pero tienen poca utilidad clínica	alcohol	Ninguna	Bebidas
	cafeína	Tratamiento migraña	Bebidas
	marihuana	¿Dolor crónico?	Recreativo
Drogas ilícitas usadas como drogas sociales sin ninguna utilidad clínica	MDMA o éxtasis	Ninguna	Recreativo
	Cocaína	Ninguna	Recreativo
Productos naturales reconocidos por	Vit A (cremas)	¿Previene el envejecimiento de la piel?	
	Vit C	¿Suplemento nutricional?	Antioxidantes y usos

efectos tan diversos como abarcadores	Aceites pescado Hierbas	¿Suplemento nutricional? Ninguna	diversos, para muchas condiciones
---------------------------------------	----------------------------	-------------------------------------	-----------------------------------

Con similitudes y diferencias, sin embargo, todas estas drogas parecen satisfacer tanto el principio de “droga sólo para el placer” como las fantasías y deseos de sus seguidores ¿consumidores?, ¿pacientes?, ¿enfermos?, ¿grupos *target*? o simplemente sujetos de un mundo bastante turbulento en pleno cambio de paradigma.

Enfermedad o no-enfermedad, ¿dónde está el límite?

Cómo establecer el límite entre salud y bienestar, entre necesidades y deseos, entre pacientes y consumidores, parece ser la clave para comprender la diferencia entre un medicamento a secas y un medicamento para el estilo de vida. Y esta cuestión no es menor si se analiza el tema desde una perspectiva sanitaria, ya que muchas de las drogas para el estilo de vida son prescriptas y gozan de los descuentos y prerrogativas garantizados por los sistemas de salud y asistencia social de los distintos países. Además, por lo general la población que las usa es mucho mayor que la prevista al momento de ser aprobada y por períodos más largos. Sin duda, si se enfoca el uso desmedido de drogas asociadas al estilo de vida con la lógica de caja, esta nueva práctica ocasiona un gasto extra para los servicios de salud públicos y privados. Pero también genera una distorsión, o al menos bastante ruido, en una cuestión cultural como es el requisito de racionalidad y conocimiento necesario para fundamentar toda prescripción de un medicamento.

Por otro lado, esta nueva categoría de drogas pone en tela de juicio la definición de “salud” y “enfermedad” y supone así la posibilidad de “definir las no-enfermedades”. Con este fin, Richard Smith, como editor del *British Medical Journal*, una prestigiosa revista de investigación clínica, convocó en 2002 a una votación electrónica entre sus lectores para hacer un *ranking* de las diversas “condiciones médicas” que no se consideran enfermedades o, como él las llamó, las “*top 100 non-diseases*” (4). La propuesta estaba basada en un estudio similar realizado en 1979 donde se consultó a personas de diferente formación -académicos médicos y no médicos, estudiantes secundarios y paramédicos- acerca de cuáles de las 38 condiciones o estados de salud listadas en la encuesta eran consideradas enfermedades (5). El resultado del relevamiento de 2002 ubicó al envejecimiento en el tope de las no-enfermedades, entre otras como la celulitis, la calvicie, la “resaca” y la infelicidad (4), a diferencia del estudio de 1979, donde sólo el 20 por ciento de los consultados daba a estas condiciones el rango de enfermedad.

Ciertamente, definir el estado de enfermedad no es tarea fácil y se encuentran en los diccionarios frases como “estado insalubre del cuerpo o la mente, desorden, dolencia con signos o síntomas distintivos”. Ninguna definición parece satisfactoria, especialmente debido a que es aun más difícil definir “salud” que “enfermedad”. Al respecto, Smith cita con un imperdible humor inglés el comentario de un colega cirujano y ensayista, a propósito del concepto de salud definido por la Organización Mundial para la Salud (OMS): si salud es lo que define la OMS como un “estado de bienestar físico, psicológico y social completo”, entonces se alcanza sólo en el momento de clímax simultáneo, dejándonos a todos en la categoría de poco saludables la mayor parte del tiempo y, según las definiciones de los diccionarios, “enfermos”.

Otro ladrillo en la pared

Un tema que agrega más materia para el debate, preocupa a las autoridades sanitarias y, en general a padres y docentes, es la extensión y rápida difusión de las drogas para el estilo de vida



entre los adolescentes. Con una frecuencia cada vez mayor se detecta el uso y abuso de medicamentos con prescripción y otros de venta libre entre los adolescentes con fines recreativos o para enfrentar situaciones que requieren alto rendimiento físico o intelectual. Así, al abuso de drogas ilícitas se suma ahora el abuso de medicamentos de fácil acceso que se emplean con fines distintos a la indicación médica original. Un estudio realizado entre más de 7300 adolescentes en los Estados Unidos en 2004 indica que aproximadamente el 18 por ciento usa la droga hidrocodona (Vicodin®) con fines recreativos y el 10 por ciento, OxyContin®, ambas son analgésicos de la familia de los opiodes. Por otro lado, el 10 por ciento ha tomado metilfenidato (Ritalina®) sin prescripción médica y un porcentaje similar de medicamentos para la tos de venta libre que contienen dextrometorfano, miembro de la familia de los opiodes. Estas prácticas han invadido la cultura adolescente al punto de que alrededor del 30 por ciento de los adolescentes dice tener amigos que consumen medicamentos de este tipo con fines estimulantes y casi iguala en frecuencia al consumo de drogas ilícitas como marihuana y cocaína, entre otras.

Respecto de la familiaridad de los adolescentes con algunos de estos medicamentos, vale comentar que la Ritalina® es una medicación que se indica para niños y adolescentes que tienen dificultades para concentrarse por un síndrome conocido como déficit de atención e hiperactividad, la sigla en inglés es ADHD. En el mismo sentido, cerca de la mitad de los adolescentes creen que las drogas para el estilo de vida son de más fácil acceso, por ejemplo en los botiquines de sus padres o de los padres de sus amigos y que son mucho más seguras que las drogas “de la calle”.

Por último, el informe revela que los adolescentes conocen en detalle los efectos de las distintas drogas, sus nombres comerciales y la variada lista de nombres coloquiales (*slang*) que identifica a cada una de ellas.

El tema de las drogas para el estilo de vida usadas con fines recreativos genera mucha controversia y no faltan comentarios que critican el tono puritano de la regulación de estas drogas y agregan que la “quimicalización de la felicidad” se puede lograr como un evento controlado en el organismo y esto no es necesariamente malo (3). A propósito de estas consideraciones, Rod Flower, profesor de farmacología del *William Harvey Research Institute* de Londres, señala que la moral es una construcción cultural que varía con el tiempo y los lugares, pero que no es este el caso de la farmacología de los medicamentos. Las ciencias duras -continúa Flower- nos indican que habrá un alto costo social a pagar si se libera completamente el acceso a las drogas recreativas, pero que hay instancias en que la legalización sería una opción razonable y probablemente con menos daño para la sociedad que el causado por las drogas “aceptadas socialmente”.

Consideraciones finales

Las derivaciones sociales y culturales que se originan en esta nueva práctica de consumir drogas o medicamentos para satisfacer un estilo de vida se pueden ver a diario en las poblaciones urbanas: farmacias que parecen supermercados, comprimidos y cremas que contienen principios farmacológicos activos se anuncian como un objeto más de consumo masivo, las prescripciones ceden lugar a los consejos publicitarios y la aparición de un nuevo nicho, los “pacientes sanos”.

Por otro lado, en los países desarrollados, la población mayor de 40 años tiene una nueva percepción de la salud, como una mejora en el bienestar general. Estas personas, que en muchos casos pagan un seguro de salud, se consideran involucradas en la toma de decisiones sobre coseguros para adquirir medicamentos y esto incide en el mercado farmacéutico. Este cambio cultural tiene consecuencias inmediatas en las estrategias de comercialización y de investigación y desarrollo en los laboratorios productores de medicamentos que ven en las llamadas “drogas para el estilo de vida” - consideradas como nuevo grupo- una forma de compensación económica muy accesible y favorable.

Por el momento, ante esta perspectiva y sobre la base del valor de la prescripción médica y el uso racional de medicamentos, parece más pertinente hablar de la aparición de un nuevo hábito social, como es incluir ciertos medicamentos entre los objetos de consumo para atender a un estilo de vida, que clasificar a las drogas utilizadas por estas prácticas dentro de una nueva categoría.

Nota agregada en la prueba de edición: En el último número de la revista de investigación clínica *New England Journal of Medicine* del 8 de septiembre (*), el Dr. Avorn -Profesor de Medicina en *Harvard Medical School* y Jefe de la División de Farmacoepidemiología y Farmacoeconomía del Hospital *Brigham and Women's* en Boston- critica la falta de cuidado con que la FDA aprueba los medicamentos para el estilo de vida. Esto no se debe –señala el autor- a un descuido o “dejadez” en la calidad de ejecución del organismo regulador, que considera alta, sino en las preguntas que formula este ente. Según Avorn, “como un paciente con un desorden obsesivo-compulsivo”, la agencia está preocupada exclusivamente por supervisar la ejecución metódica de actos relativamente simples como probar que una medicación es superior al placebo para producir un efecto y, esencialmente, “hace las preguntas equivocadas”. Avorn, que es el autor de *Powerful Medicines: the Benefits, Risks and Costs of Prescription Drugs* (Medicinas poderosas: beneficios, riesgos y costos de los medicamentos con receta), fundamenta su crítica en los “medicamentos para el estilo de vida”. El autor destaca que estos medicamentos son consumidos por períodos extendidos y por una población mucho mayor que la prevista en la indicación original de la droga por lo cual “es particularmente importante sopesar los riesgos y beneficios y la FDA por lo general no solicita tal evaluación”.

(*) Avorn J. *FDA Standards — Good Enough for Government Work?* *New Engl J Med.* 353: 969-972, 2005)

Referencias

1. Gilbert D, Walley T, New B. 2000. *Lifestyle medicines*. *Br Med J* 321:1341-1344.
2. *International Conference on Harmonisation* (ICH) en el sitio de la FDA. <http://www.fda.gov/cder/guidance/guidance.htm> International Conference on Harmonisation
3. Flower R. 2004. *Lifestyle drugs: pharmacology and the social agenda*. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 182-185.
4. Smith R 2002. *In search of "non-disease"*. *Br Med J* 324: 883-885
5. Campbell EJM, Scadding JG, Roberts RS. 1979. *The concept of disease*. *Br Med J* ii: 757-762.

*Claudia Pérez Leirós
Investigadora del CONICET
Profesora de Farmacología
Universidad de Buenos Aires

El heterocomplejo hsp90•inmunofilina de alto peso molecular como maquinaria molecular de transporte de proteínas solubles

Dr. Mario D. Galigniana*

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires-Fundación Instituto Leloir
Av. Patricias Argentinas 435, Buenos Aires (C1405BWE), Argentina.
Tel. 54-11-5238 7500 (Ext. 3308); Fax 54-11-5238-7501
E-mail: mgali@leloir.org.ar

Recibido: 14/6/05

Aceptado: 28/6/05

RESUMEN

Es sabido que el movimiento de proteínas englobadas en vesículas utiliza al citoesqueleto como vía de transporte. Sin embargo, nada se sabe acerca del mecanismo de transporte de proteínas solubles no asociadas a vesículas. Factores relacionados a cascadas de señales como MAPKs, STATs, p53, NF κ B, receptores de esteroides, ciclinas, etc., no están confinados de manera estática a un compartimiento celular dado como el citoplasma o el núcleo, sino que se encuentran en equilibrio dinámico entre dichos compartimientos, aún cuando el factor en cuestión se encuentre mayoritariamente concentrado en uno de ellos. Siempre se ha asumido que la fuerza que genera el movimiento de proteínas solubles es la difusión simple. La deslocalización de proteínas produce grandes trastornos en la célula y es responsable de por lo menos doscientas patologías bien caracterizadas, entre ellas varios tipos de cáncer. En consecuencia, responder cómo las proteínas solubles se mueven es aún una asignatura pendiente muy importante para la Biología Celular, en particular cuando se trata de factores relacionados con las cascadas de señales. Los receptores de hormonas corticosteroides constituyen un excelente modelo experimental para el estudio del tránsito de proteínas solubles ya que la localización subcelular de los mismos puede ser manipulada por agregado o no de la hormona. Es así que estos receptores se localizarán mayoritariamente en el citoplasma en ausencia de ligando y serán nucleares en su presencia. El modelo clásico de activación de receptores esteroidales sostiene que, al unirse la hormona, el complejo formado por la chaperona hsp90 y las inmunofilinas de alto peso molecular (IMMs) debe disociarse del receptor (un paso conocido como "transformación"). Este modelo ha sido aceptado heurísticamente durante más de una década, aunque carece de sustento experimental. Nosotros proponemos un modelo para el mecanismo de acción de receptores esteroidales (el que también podría ser válido para otras proteínas solubles) en el cual el complejo hsp90•IMM asociado al receptor es requerido para el transporte retrógrado de éste sobre los filamentos del citoesqueleto, siendo la proteína motora dineína, la que provee la fuerza motriz para este movimiento. Como corolario, se debe inferir que la transformación debería ocurrir cuando el heterocomplejo receptor•hsp90•IMM es transferido a la maquinaria que lo translocará a través del poro nuclear o una vez que se encuentre en el nucleoplasma.

The hsp90•high molecular weight immunophilin heterocomplex as a molecular machinery for soluble protein trafficking

ABSTRACT

Although movement of proteins comprised in vesicles is known to occur on cytoskeletal tracts, the movement of non-vesicle associated proteins is unknown. Soluble proteins such as MAPKs, STATs, p53, NFkB, steroid receptors, cyclins, etc. are not confined to the cytoplasm or the nucleus in a static manner, but are capable of shuttling dynamically through the nuclear pore even when the number of molecules in a given compartment is overwhelmingly larger than the small number located in the other compartment. Moreover, it has always been posited that soluble proteins move by diffusion. Protein mistargeting has dire cellular consequences and leads to a large variety of pathologies, including cancer. In this regard, more than 200 diseases have been related with failures in the transport or mislocalization of proteins. Therefore, a major unsolved problem that pertains to all signaling pathways relates to how proteins move to their sites of action. Corticosteroid receptors constitute an excellent system for studying protein movement. They are primarily located in the cytoplasm in the absence of ligand and rapidly move towards the nucleus with ligand. A classical model proposed more than a decade ago posited the notion that, upon steroid binding, the hsp90•immunophilin (IMM)-heterocomplex must dissociate from the receptor (a process normally referred to as “transformation”), which in turn, permits its nuclear translocation. Although heuristic, the model has no substantial experimental support. Our experimental evidence shows that the hsp90•IMM complex is required for the retrograde movement of corticosteroid receptors (and perhaps, for others soluble factors), the motor protein dyenin being the responsible for powering this movement along cytoskeletal tracts. As a consequence, it may be inferred that transformation of the receptor•hsp90•IMM should take place when the heterocomplex is transferred to the translocation machinery responsible for its passage through the nuclear pore or when the receptor is nucleoplasmic.

Introducción

Durante los últimos años se ha evidenciado un incremento exponencial en el número de estudios que han relacionado a los factores involucrados en las cascadas de señales con su redistribución en los distintos compartimientos celulares como consecuencia de variados estímulos. Este inusitado interés por estudiar la distribución de proteínas solubles no es sorprendente si consideramos la importancia que poseen muchos de estos factores en el normal funcionamiento de la célula, tal que una redistribución incorrecta conlleva casi ineludiblemente a un desbalance funcional que **no sólo** se traduce en algún tipo de patología grave, sino irreversible.

Hoy resulta claro que la mayoría de las proteínas solubles no se encuentran estáticamente confinadas en un compartimiento celular dado sino que son transportadas de manera constante y dinámica entre ellos (1-4), lo que representa un paso esencial en el mecanismo molecular para que tales factores adquieran o repriman determinado tipo de funciones. Resulta un hecho indiscutido que proteínas englobadas en vesículas deben viajar a sus destinos finales (p.ej., el terminal axónico o la membrana plasmática) por un mecanismo activo de transporte en donde las vesículas requieren de proteínas motoras asociadas a componentes del citoesqueleto (5-8). Este concepto se encuentra muy arraigado para las proteínas vesiculares, pero no ocurre lo mismo con las proteínas solubles. En la mayoría de los casos, los investigadores nos hemos concentrado en analizar el transporte de estos factores solubles considerando desde y hacia dónde se produce tal tránsito, pero raramente nos hemos preguntado cómo se mueve tal factor desde y hacia sus sitios de acción. En este sentido, el concepto histórico que aún hoy persiste, es aceptar por omisión que las proteínas difunden y se concentran en sus sitios de acción según el equilibrio entre lo “libre” y lo “unido”.

Podemos imaginar que una proteína soluble viaja por simple difusión y que, al colisionar de manera estocástica con otras proteínas estructuralmente complementarias o con determinadas estructuras celulares, podría quedar atrapada en su sitio de acción. Este modelo proveería una explicación simple para comprender la distribución intracelular de los factores solubles e implica la existencia de un primer paso en el que el factor en cuestión deba distribuirse por todos o casi todos los compartimientos a los que tiene acceso, para finalmente concentrarse en su sitio de acción al quedar “atrapado” en él por interacciones moleculares específicas.

A priori, esta explicación no se condice con la eficiencia, eficacia y especificidad con las que funcionan las proteínas relacionadas a las cascadas de señales. Además, eventos celulares críticos dependientes de un mecanismo de transporte basado exclusivamente en procesos fisicoquímicos que resultan en la colisión estocástica de factores solubles también se encuentra en inevitable colisión con dos conceptos biológicos elementales como son la especificidad de acción y el principio de compartimentalización celular.

Es un hecho fácilmente comprobable que una proteína soluble fácilmente visible, p.ej., por estar fusionada a GFP (*green fluorescent protein*), puede distribuirse en forma casi homogénea por todo el espacio citoplasmático o nuclear, según le corresponda a su localización primaria. En otras palabras, los procesos fisicoquímicos que rigen el modelo clásico tienen lugar y la difusión de proteínas solubles es un hecho. No obstante ello, cabe preguntarnos si este mecanismo de distribución de factores en la célula se condice con sus funciones biológicas ¿Cómo compatibilizar entonces el hecho de que una cascada de señales se active y no lo hagan otras que potencialmente se dispararían por el/los mismo/s intermediario/s?

Los efectos biológicos requieren de la activación de moléculas específicas, localizadas en dominios determinados y, fundamentalmente, en un tiempo de activación apropiado, requisitos todos ellos que no se explican con el modelo antes descrito. Es más razonable imaginar un modelo en el que las proteínas se focalicen en forma rápida y eficiente a sus sitios de acción tal que éstos y no otros se activen en primer término, permitiendo que al mismo tiempo se activen (o no, según la conveniencia biológica de hacerlo) los mecanismos de represión para silenciar o modular a aquéllas cascadas que también podrían activarse *a posteriori*, es decir, cuando el factor ha difundido por todo el compartimiento.

Podría entonces plantearse un modelo que compatibilice el modelo “clásico” basado en el movimiento estocástico de los factores solubles y el “focalizado” hacia sus sitios de acción si imagináramos cierta vecindad entre los componentes de la maquinaria molecular de activación de un proceso biológico, lo que proveería cierto grado de especificidad de la respuesta dentro de un marco de tiempo adecuado ¿Qué ocurre entonces cuando los componentes no están tan próximos y la señal debe viajar? Para focalizarla hacia un sitio dado podríamos asignarle un rol a los filamentos del citoesqueleto, los que están altamente cargados y delimitan callejones polianiónicos capaces de interactuar con los grupos cargados de las proteínas en movimiento. Si éstas poseyeran sitios ricos en aminoácidos básicos como arginina y lisina, los que estarán protonados a pH fisiológico, se restringiría la difusión de la proteína soluble debido a interacciones electrostáticas con los filamentos, mientras que aquéllas que fueran más aniónicas verían restringidas tales interacciones por repulsiones electrostáticas que “dirigirían” la difusión en una trayectoria más restringida. Además, la velocidad de la difusión se podría regular por cambios en la arquitectura y composición de los filamentos del citoesqueleto, aunque estos cambios, si bien dinámicos y rápidos, serían aún lentos comparados con la velocidad de migración de las proteínas solubles. Además, si bien este modelo otorga cierta direccionalidad al movimiento así como cierto grado de regulación de la velocidad de migración del factor soluble, sigue delegando la responsabilidad de procesos biológicos básicos a una migración estocástica y no del todo regulable en los cortos tiempos requeridos para ciertos procesos. También se puede argüir que complejos macromoleculares como los

formados por los SRs con las chaperonas, co-chaperonas, IMMs y proteínas regulatorias (9), se verían limitadas grandemente en cuanto a su velocidad de difusión "dirigida". Se ha determinado que la velocidad de difusión en las zonas adyacentes a los filamentos se encuentra grandemente retardada debido al alto grado de compactación de complejos que tornan el medio sumamente viscoso (10, 11).

Un mecanismo alternativo para el movimiento de proteínas solubles y que haría compatible tal transporte con la eficacia, eficiencia y especificidad con las que ocurren en la célula implicaría el uso de la maquinaria molecular de transporte de vesículas ya existente en la célula para el transporte de los factores solubles. Recientemente, la visualización del interior celular por tomografía crioelectrónica evidenció que el citoplasma se encuentra altamente compactado con filamentos del citoesqueleto y macromoléculas solubles que parecieran asociarse a esos filamentos (11), lo que sería más compatible con la existencia de unidades funcionales que con un transporte mediado por simple difusión. Para estudiar este posible mecanismo, hemos utilizado a los receptores de esteroides (SRs) como modelo. Esto es porque es muy simple regular la localización subcelular de los mismos por parte del operador. El receptor de glucocorticoides (GR) o el de mineralocorticoides (MR) será primariamente citoplasmático en ausencia de ligando, mientras que translocará rápidamente al núcleo por agregado de la hormona. Cuando ésta es retirada del medio, el receptor recicla al citoplasma y queda a la espera de un nuevo estímulo para migrar nuevamente al núcleo (12, 13).

El complejo SR•hsp90•IMM

Para comprender mejor cómo se mueven los SRs en la célula, primero debemos explicar sus propiedades. Los SRs son factores de transcripción que se activan por ligando y que forman una subfamilia dentro de la superfamilia de receptores nucleares (14). Varios miembros de esta familia presentan la propiedad de ser mayoritariamente citoplasmáticos en ausencia de ligando (GR, MR, AR, VDR, AhR, CAR, etc.), mientras que otros son constitutivamente nucleares (PR, ER, ERR, TR, RAR, etc.). Todos ellos se concentran en áreas nucleares determinadas cuando unen ligando. Ya sea que el equilibrio se desplace hacia el citoplasma o hacia el núcleo, todos los factores se encuentran sujetos al tránsito dinámico entre ambos compartimientos.

La estructura básica de un receptor nuclear se muestra en la Fig.1 y consiste en cinco ó seis regiones (según el receptor) nombradas con letras (de la A a la E-F). No obstante esta nomenclatura moderna (15), las diferentes regiones continúan siendo llamadas por sus nombres convencionales, los que se utilizarán en este artículo. La región central (o C) es la mejor conservada, por lo que se la utiliza como patrón de comparación filogenético. La región C es la responsable de la unión del receptor a las secuencias específicas en el ADN, por lo que convencionalmente nos referimos a ella como región DBD (*DNA-binding domain*). La misma incluye a dos regiones adyacentes plegadas como un rulo alrededor de un catión Zn^{2+} y que delimitan las dos áreas del tipo "Zn-fingers" (dedos de Zn) responsables de la interacción directa con la doble hélice del ADN. La región E-F que se encuentra hacia el extremo C-terminal del receptor tiene un moderado grado de conservación que varía según los receptores que se comparen entre sí, y que es responsable del reconocimiento de la hormona. Su nombre convencional es LBD (*ligand-binding domain*). El LBD está separado del aminoácido C-terminal por una secuencia pequeña y no conservada (región F) cuya función no se encuentra bien definida, pero que podría conferirle al SR especificidad de ligando y/o de actividad transcripcional. En el LBD se identifican la secuencia responsable de la dimerización de los SRs y una secuencia llamada AF-2 (*activation function-2*) que confiere la especificidad transcripcional según el ligando unido. Finalmente, en la mitad N-terminal del receptor se encuentra una región hipervariable (A-B) que se asocia a la actividad transcripcional relativamente independiente de ligando, es el dominio TD (*transactivation domain*). Aunque el dominio TD es muy variable entre los miembros de la subfamilia, se encuentra muy conservado evolutivamente para un receptor dado (16).

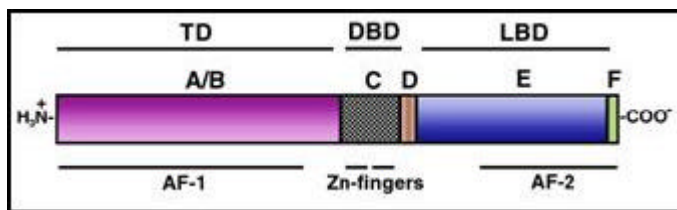


Figura 1. Arquetipo de receptor nuclear

En el caso de la subfamilia de SRs, sus miembros no existen aislados sino en forma de heterocomplejos con chaperonas y co-chaperonas. Las chaperonas constituyen una familia de proteínas altamente conservadas en la evolución que participan en el correcto plegado y ensamblaje de las proteínas, un proceso en el que frecuentemente se requiere la hidrólisis del ATP mediada por la actividad de ATPasa de la chaperona (17). Por otra parte, las co-chaperonas asociadas a la chaperona primaria las “asisten” en su función. La mayoría de las chaperonas (cuyo arquetipo es hsp70), poseen la propiedad de plegar a las proteínas desnaturalizadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Hay otras chaperonas las que, si bien poseen la capacidad de recuperar el correcto plegado de proteínas desnaturalizadas en un sistema libre de células, en células intactas interactúan con aquellas proteínas celulares que ya poseen cierto grado de organización en su estructura terciaria, lo que favorece entonces la maduración de la estructura de la proteína “cliente” antes que el plegamiento terciario elemental y, consecuentemente, les confieren funcionalidad (18, 19). El típico ejemplo es hsp90, la chaperona esencial que constituye el centro de gravedad del heterocomplejo asociado a SRs.

Si bien los complejos SR•hsp90 son fácilmente aislados de extractos citosólicos, hsp90 purificada no se une a GR. No fue sino hasta cuando se tradujo a GR en lisados de reticulocitos que se pudo estudiar cada paso del ensamblado del heterocomplejo en extractos libres de células, lo que llevó al relativamente reciente modelo que se esquematiza en la Fig.2 (17). El apo-GR (no asociado a chaperonas) no tiene capacidad de unir ligando debido a que el LBD se encuentra colapsado impidiendo el acceso del esteroide a su sitio de unión. El complejo hsp90•hsp70 preexiste en el citosol gracias a la acción de la chaperona Hop (*heat-shock-organizing protein*), antiguamente conocida como p60, la que actúa de puente entre el dímero de hsp90 y una molécula de hsp70 (el nombre Hop alude a su función de proteína “organizadora”). Normalmente, hsp40 siempre se encuentra asociada a hsp70 y es requerida en cantidades subestequiométricas para favorecer este proceso de ensamblado.

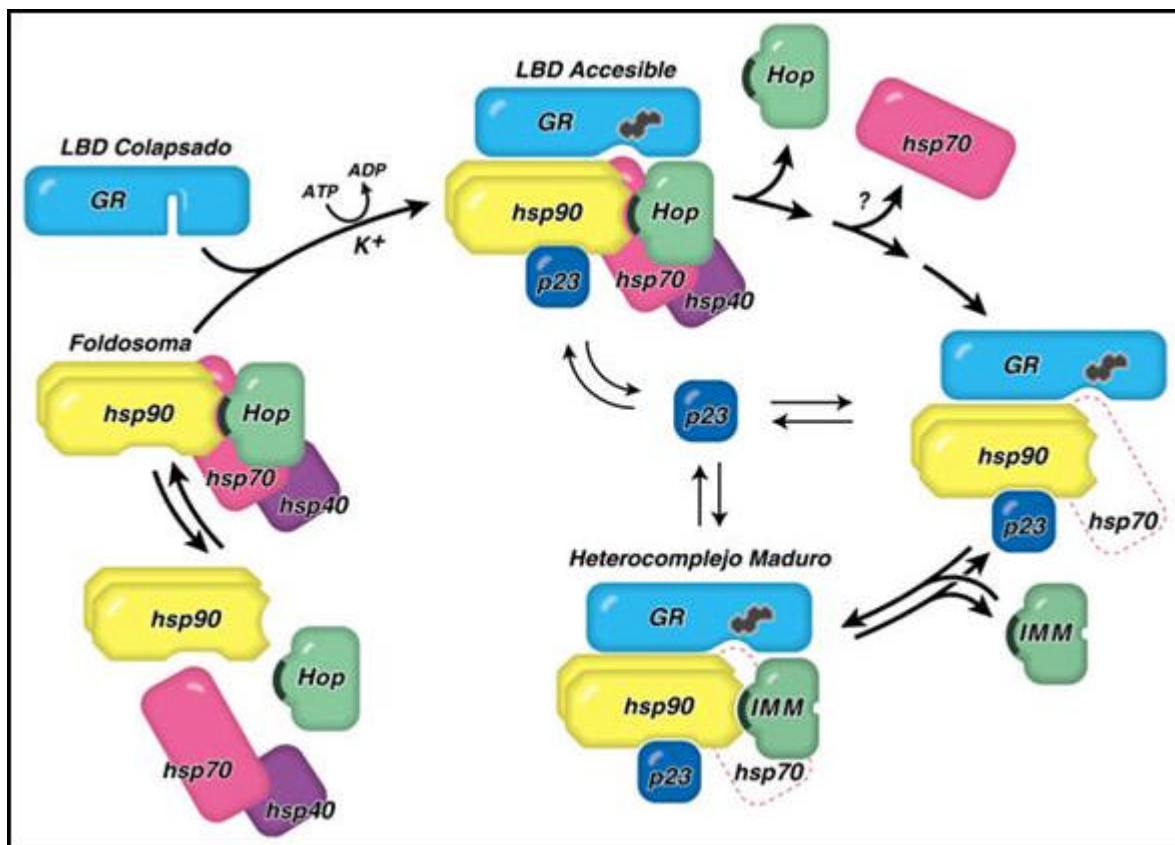


Figura 2. Ciclo de maduración de GR

Luego, el complejo $(hsp90)_2 \cdot Hop \cdot hsp70/hsp40$, al que hemos llamado "foldosoma", se transfiere de manera ATP/Mg^{2+} y K^+ dependiente al aporreceptor, tal que favorece la "apertura" del LBD y por ende, la entrada del ligando. En consecuencia, la principal diferencia de este complejo intermedio GR-chaperonas con respecto al aporreceptor es que GR será ahora capaz de unir hormona (20, 21). Una vez que el complejo se ha formado, la pequeña co-chaperona ácida p23 se asocia dinámicamente al dímero de hsp90 estabilizando el complejo. Tal función estabilizante puede ser reemplazada por agregado de molibdato de sodio al *buffer* de homogenización.

Resulta importante enfatizar que Hop es una proteína que presenta secuencias TPR (*tetratricopeptide repeats*), es decir, secuencias de 34 aminoácidos que se repiten en tándem y que son importantes para las interacciones proteína-proteína (22). Hop se une al sitio aceptor para proteínas TPR presente en el dímero de hsp90 de manera mutuamente excluyente con otras proteínas TPR, tal que cada dímero de hsp90 poseerá asociado sólo una proteína TPR dada (23).

Una vez que se ha formado el heterocomplejo entre las chaperonas y el receptor, Hop se disocia del mismo dejando un intermediario que posee el sitio aceptor TPR vacante. Dependiendo del tipo celular y las condiciones de estrés a las que se las somete, hsp70 puede o no abandonar al heterocomplejo en este paso. El sitio TPR que queda vacante se completa en el estadio final con otras proteínas que poseen secuencias TPR y que resultarán esenciales para la estructura final del complejo maduro, son las inmunofilinas de alto peso molecular (IMM).

Inmunofilinas

Las inmunofilinas constituyen una familia de por lo menos 35 proteínas codificadas en diferentes genes y que presentan la particularidad de unirse o bien a la

drogas inmunosupresoras rapamicina y FK506 (subfamilia FKBP, por *FK506-binding protein*) o a la droga ciclosporina-A (subfamilia CyP, por *cyclosporin-binding protein*) (24, 25). Los arquetipos de IMM asociadas a la inmunosupresión son las IMM de bajo peso molecular FKBP12 (12-kDa) y CyP-A (17-kDa). El efecto inmunosupresor se debe a que el complejo droga-IMM actúa como inhibidor de la subunidad catalítica de la calcineurina (o fosfatasa PP2B dependiente de Ca^{2+} /calmodulina), la que no desfosforila entonces al factor transcripcional NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) de los linfocitos T, éste no migra al núcleo y consecuentemente se inhibe la producción de interferón- γ e interleuquinas (26).

En el caso de las IMM de alto peso molecular, la función no está del todo definida. Como ocurre con la mayoría de los miembros de la familia, estas IMM unen a las drogas inmunosupresoras, pero no están relacionadas de modo alguno con la inmunosupresión. Varias de estas IMM de alto peso molecular son chaperonas y se recuperan asociadas a los receptores de esteroides. La Fig. 3 muestra la estructura comparativa de las cinco IMM hasta hoy descritas como partes del heterocomplejo SR•hsp90 (25). El dominio característico de las IMM es el dominio PPlasa (celestes), lugar en donde se une la droga inmunosupresora y reside la actividad enzimática de rotamasa o peptidil-prolil isomera (PPlasa), lo que significa que una IMM puede transformar uniones peptídicas X-Pro de *cis* a *trans* y viceversa. Esta actividad enzimática es muy evidente en ensayos *in vitro* con oligopéptidos, pero los resultados no son aún contundentes para afirmar fehacientemente que afecta la estructura terciaria de las proteínas en el entorno celular, aunque es muy probable que así sea.

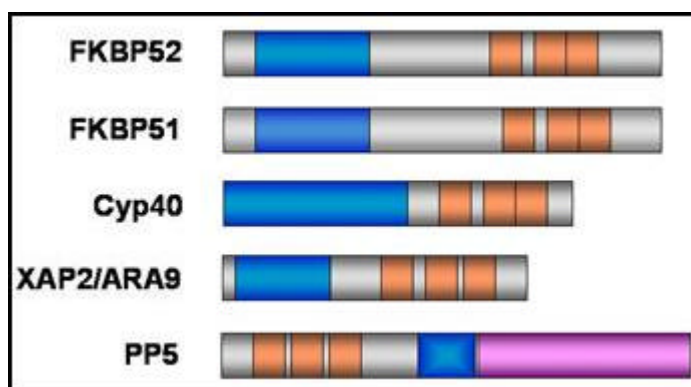


Figura 3. Estructura de IMM asociadas a SRs

Los dominios TPR de estas IMM son representados en anaranjado y son los responsables de su asociación con hsp90.

Comparativamente, las IMM de bajo PM CyP-A y FKBP12 equivalen sólo al dominio PPlasa de las de alto PM (entre los cuales hay una homología significativa), pero carecen de dominios TPR por lo que no se asocian al sitio aceptor presente en el dímero de hsp90.

FKBP52, FKBP51 y CyP-40 se encuentran en cantidades significativas en los complejos con SRs. La IMM XAP2 (también conocida como ARA9 ó AIP) es exclusiva del receptor AhR (receptor de aril-hidrocarbano o receptor de dioxano), el que tiene la propiedad de no asociar a las otras IMM, sino sólo a XAP2 (27).

Recíprocamente, aquéllos SRs que sí unen a las otras IMM, no interaccionan con XAP2. Finalmente, PP5 es una Ser/Thr fosfatasa que posee un dominio "IMM-like" que une FK506 (aunque carece de actividad enzimática) y que es un componente mayoritario del heterocomplejo (12, 28, 29), aunque se desconoce al presente si su actividad de fosfatasa afecta la fisiología del receptor al que está unido.

Las IMM de alto PM unen dineína

Una propiedad interesante de las IMM de alto PM es que se unen a la proteína motora dineína (30), la que es responsable del transporte retrógrado de vesículas. Por otra parte, a una parte de la fracción citoplasmática de las IMM de alto PM se las visualiza asociadas a los microtúbulos (31). Además, como las IMM son parte del heterocomplejo de los SRs, se puede inferir que éstos se mueven hacia el núcleo sobre los filamentos del citoesqueleto utilizando a la dineína como fuerza motora. Esta hipótesis se vió potenciada cuando al inmunoprecipitar a GR no sólo se co-inmunoprecipitó a hsp90 y a las IMM, sino también a dineína (30).

Con el objeto de analizar cómo son las interacciones en el heterocomplejo, se inmunoprecipitó a GR, luego se disociaron las proteínas endógenas co-inmunoprecipitadas por incubación en un buffer de alta fuerza iónica y, finalmente, se reincubó a GR "desnudo" con lisado de reticulocitos (RL) más un sistema regenerador de ATP a fin de reconstituir el complejo sobre el receptor en varias condiciones (30). Cabe aclarar que en el RL no expresa GR, pero sí posee todas las proteínas del heterocomplejo. Los resultados se muestran en la Fig.4.

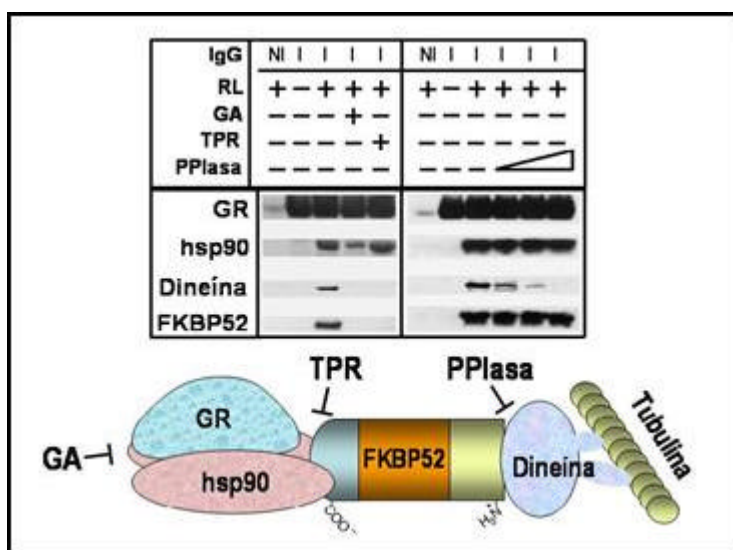


Figura 4. Modelo de ensamblado del transportosoma. El receptor de glucocorticoides (GR) fue inmunoprecipitado con una IgG específica o inmune (I) o un control no inmune (NI). Las proteínas endógenas fueron disociadas con fuerza iónica y el GR "desnudo" fue incubado con lisado de reticulocitos (RL) suplementado con el inhibidor de hsp90 geldanamicina (GA), el péptido recombinante correspondiente al dominio TPR de la IMM, o el péptido correspondiente al dominio PPIasa. El complejo reconstituido fue revelado por *Western blotting*. El modelo inferido a partir de estos resultados se esquematiza en la parte inferior de la figura.

El control no incubado con RL muestra que el tratamiento con alta fuerza iónica ha disociado a todas las proteínas unidas a GR, las que se reensamblan al reincubar con RL, incluyendo a la proteína motora dineína. En este experimento se muestra sólo a la cadena intermedia de dineína (responsable de interactuar con la "carga"), pero también se co-inmunoprecipitan las cadenas livianas y pesadas de la proteína motora. Tubulina sigue el mismo patrón que dineína si la homogenización se realiza en un *buffer* que preserva el grado de polimerización de los microtúbulos.

Cuando la incubación con RL se realizó en presencia del inhibidor de hsp90 geldanamicina (GA) (32) no se reconstituyó el complejo, indicando que dineína no se une en forma directa al receptor. Cuando se saturó al RL con el péptido TPR a fin de inhibir la unión de la IMM FKBP52 al complejo GR•hsp90, no se recuperó dineína. Ello indicó que la misma tampoco se une al dímero de hsp90. Al saturar el sistema de reconstitución con el dominio PPIasa de la IMM, se restaura eficientemente el complejo

GR•hsp90•FKBP52, pero la dineína es competida de manera dependiente de la concentración de PPIasa sin que se afecten las otras proteínas del complejo, lo que nos indicó claramente que la proteína motora se une al dominio PPIasa de la IMM. Con posterioridad, se demostró que esta propiedad es compartida por CyP-40 y PP5 (31). El modelo diagramado en la parte inferior de la Fig.4 representa al complejo SR•hsp90•IMM•proteína motora (o “transportosoma”) inferido a partir de estos experimentos.

El complejo hsp90•IMM•dineína es esencial para el retrotransporte de SRs

Estos resultados fueron obtenidos en un sistema libre de células, por lo que aún quedaba la duda de si el transportosoma cumple la función de transportar al receptor en una célula intacta. Siguiendo el mismo razonamiento que el de estos ensayos, se postuló entonces que los mismos tratamientos deberían inhibir el movimiento retrógrado de GR en una célula. Fibroblastos NIH 3T3 fueron transfectados con la proteína de fusión GFP-GR (*green fluorescent protein-GR*) y crecidos en un medio libre de esteroide (Fig.5-A); luego de 20 min de agregada la hormona, GFP-GR se concentró en el núcleo (Fig.5-B), mientras que el tratamiento de las células con GA (Fig.5-C) o la sobreexpresión del dominio PPIasa (Fig. 5-D) inhibieron parcialmente su translocación nuclear (30).

Para nuestra sorpresa, cuando la incubación con hormona se extendió a una hora, la fluorescencia se concentró en el núcleo en las células en donde se había visto inhibición (aquellas mostradas en los paneles 5-C y 5-D). Estos resultados indicaron que si bien el transportosoma es requerido para el transporte rápido y eficaz de GR al núcleo, existiría un mecanismo alternativo de movimiento que es claramente independiente del complejo hsp90•IMM (¿simple difusión?). Cabe destacar que si se tratan células transfectadas con dominio PPIasa con GA, la curva de translocación no es diferente de aquellas observadas para cada tratamiento individual, indicando que la maquinaria molecular que se afecta es la misma.

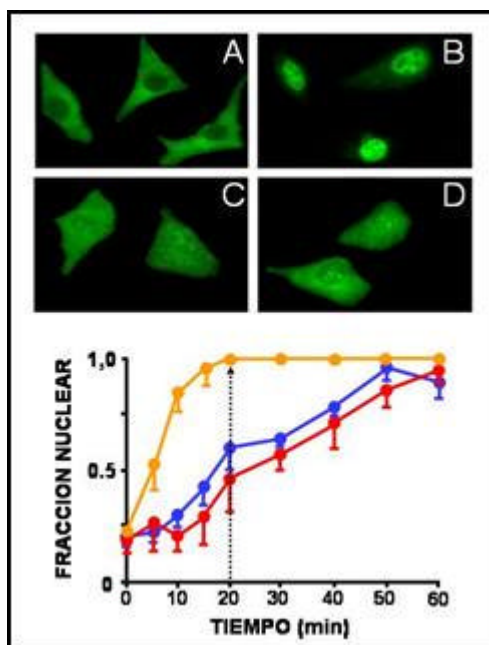


Figura 5. Translocación nuclear de GR. Células NIH-3T3 transfectadas con GFP-GR fueron crecidas en un medio libre de esteroide y tratadas por 20 min con vehículo (A) ó 100 nM dexametasona (B,C y D). Las células del panel C fueron preincubadas con hormona durante 1 h sobre hielo para favorecer la unión de esteroide y evitar la translocación de GR al núcleo. Luego fueron incubadas con el inhibidor de hsp90 GA durante 20 min adicionales. El tiempo cero en el gráfico representa el momento en el que las células se llevaron a 37°C. Las células del panel D sobreexpresan al dominio PPIasa. El gráfico inferior muestra la velocidad de translocación a núcleo en células

control (anaranjado), tratadas con GA (azul) y las que sobreexpresan el dominio PPIasa. La flecha negra marca el tiempo en el que se tomaron las fotografías de los paneles A-D.

Si fuera correcto el modelo que surge de estas observaciones y que sostiene que el complejo hsp90•IMM actúa como “puente” entre el factor a ser transportado y la proteína motora dineína, es lógico predecir que la disrupción de los componentes moleculares de dicha maquinaria de transporte debería afectar la movilidad del factor en cuestión. Que éste es el caso lo prueban los tratamientos en los cuales se afectó la función de la hsp90 (con GA) y la interacción entre la IMM y dineína (por competencia del sitio de interacción con el dominio PPIasa).

En este punto tendríamos que aclarar que la actividad motora de dineína requiere de su asociación a un complejo multiproteico llamado dinactina tal que, para ser más precisos, se debería hablar del complejo dineína/dinactina como un todo (33, 34). En trabajos realizados sobre el transporte de vesículas del Golgi se describió que la sobreexpresión de una de las once subunidades que componen la dinactina, la proteína p50/dinamitina, produce el desensamble de todo el complejo (35), tal que aún cuando dineína todavía conserva la capacidad de unirse a las vesículas del Golgi, no genera la fuerza motriz necesaria para que éstas sean transportadas a lo largo del citoesqueleto. Análogamente, se puede postular que la sobreexpresión de p50/dinamitina debería afectar el movimiento retrógrado de SRs.

La Figura 6 muestra una inmunofluorescencia indirecta para MR en un cultivo primario de células del ducto colector renal que fueron transfectadas con *myc-p50/dinamitina*, deprivadas de esteroide y tratadas con 10 nM aldosterona durante 20 min. Las flechas indican a aquellas células en las que la translocación de MR se vio inhibida por la sobreexpresión de p50/dinamitina. Similares resultados fueron obtenidos para GR en fibroblastos NIH-3T3 (36). No obstante, la curva de tiempo para la translocación de MR al núcleo demostró que al cabo de 1 h de incubación con aldosterona, MR es totalmente nuclear. Este efecto es indistinguible de aquél descrito en la Fig.5 con GA y la sobreexpresión del dominio PPIasa. En conclusión, el complejo dineína/dinactina es responsable del movimiento retrógrado de los receptores de corticosteroides, aunque el transporte puede ocurrir de manera más ineficiente en ausencia de la maquinaria molecular aquí descrita.

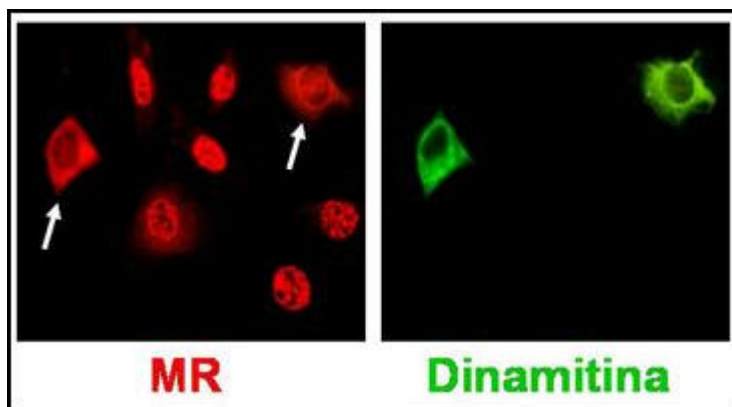


Figura 6. Efecto inhibitorio de dinamitina sobre MR

En este punto cabe preguntarnos ¿para qué posee la célula un mecanismo de transporte tan complejo si cuando éste falla la proteína igualmente alcanza su sitio de acción? Una primera respuesta se obtiene al rescatar aquél concepto que mencionamos en la Introducción: el tiempo de activación de una cascada de señales es crítico para obtener la respuesta biológica necesaria o deseada. Desde un punto de vista funcional, claramente no es lo mismo que el factor alcance su sitio de acción con una $t_{0,5}$ para la translocación nuclear de 4-5 min (como ocurre fisiológicamente con los SRs) a que lo haga con un $t_{0,5}$ de 30-40 min, tal como se observa al desacoplar a los

componentes del transportosoma (*id est*, inhibiendo a hsp90 o desacoplando el complejo con el péptido PPlase o con p50/dinamitina).

Una segunda pregunta que surge de este modelo es si los factores solubles ven impedido su movimiento cuando las distancias que deben recorrer son más grandes que las que separan a cualquier punto del citoplasma de una célula convencional de su núcleo. Un ejemplo de este caso son las neuronas, cuyos axones pueden alcanzar hasta un metro de longitud y en los que, consecuentemente, la eficiencia de un proceso de difusión (o del mecanismo alternativo que sea responsable del movimiento de los SRs) sería incompatible con la vida.

Para responder a este interrogante, se transfectaron neuronas humanas NT2 con GFP-GR y se analizó la localización del receptor por estímulo con dexametasona en células tratadas con GA, es decir, la misma condición descrita en la Fig.5-C (37). Los resultados se muestran en la Fig.7.

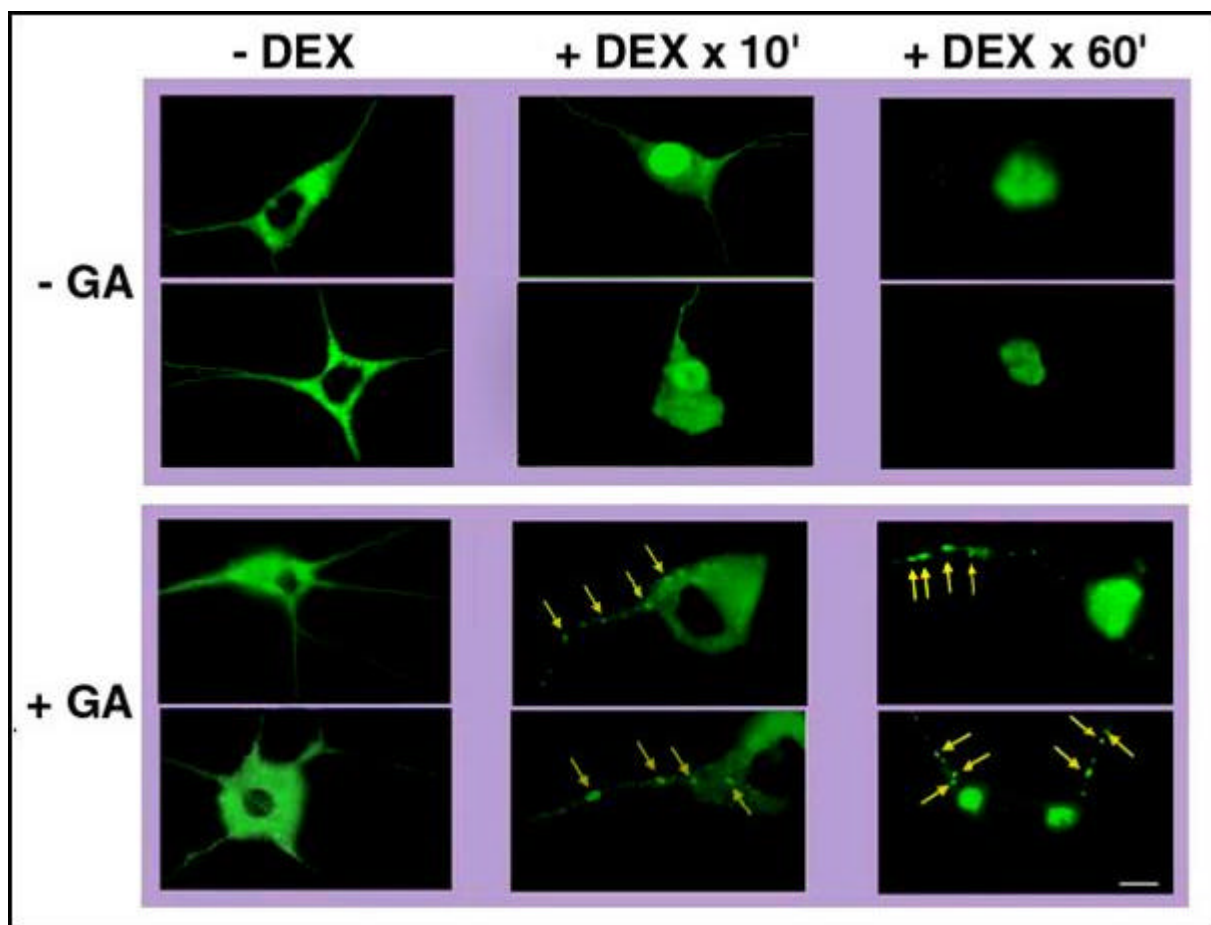


Figura 7. Geldanamicina produce la agregación de GR activado por dexametasona (DEX).

GFP-GR se visualizó diseminado tanto en el cuerpo celular como en las neuritas y migró rápidamente al núcleo por agregado de dexametasona. Sin embargo, aún pudo apreciarse fluorescencia en las neuritas y fue necesario aguardar una hora para que toda la población de receptores se concentre en el compartimiento nuclear. Como ocurrió con los fibroblastos (Fig.5), GA no afectó la distribución del receptor *per se* e inhibió la translocación al núcleo en presencia de hormona. Sin embargo, GFP-GR se agregó tanto en el cuerpo celular como en las dendritas (flechas amarillas), siendo este agregado dependiente de ambos, GA y esteroide, ya que no se lo observó con cada uno de ellos individualmente. Al cabo de 1 h, el receptor se concentró en el

núcleo, pero aún pudieron verse agregados de GFP-GR en las neuritas. Estos agregados desaparecieron cuando el medio fue reemplazado por uno conteniendo el esteroide pero no GA, lo que indicó que el proceso es reversible. No obstante, al cabo de 4 h con esteroide y GA la fluorescencia desapareció de las neuronas, un evento que se inhibió en presencia de inhibidores del proteasoma. Estos resultados indicaron que el movimiento alternativo (¿difusión?) no dependiente del complejo hsp90•IMM es tan ineficiente que el receptor se acumula en ciertas partes de su trayectoria (¿puntos de control de calidad del sistema de transporte?) y finalmente, se degrada. En otras palabras, el mecanismo alternativo de movimiento podría resultar relativamente útil para distancias cortas como las que hay en el cuerpo celular respecto del núcleo, pero es totalmente ineficaz para distancias mayores como las que debe recorrer un factor soluble en las neuritas. La interpretación de que los agregados que se muestran en la Fig.7 son centros de degradación del proteasoma fue confirmado por la visualización de las chaperonas hsp70 y CHIP que colocalizan con estos gránulos. El reclutamiento de hsp70 al proteasoma es una condición *sine qua non* para la degradación de GR y CHIP actúa como la E3 ubiquitina ligasa de GR (38).

Tomadas en su conjunto, las evidencias experimentales descritas hasta acá permiten afirmar que el retrotransporte de SRs ocurre de manera activa gracias al complejo hsp90•IMM, el que actúa como puente entre la carga y la proteína motora. El modelo presupone que hsp90 no debe disociarse inmediatamente después que la hormona se ha unido al receptor puesto que su asociación con hsp90 es aún necesaria para el transporte. Luego, el proceso de transformación de SRs debería ocurrir en un paso subsiguiente al retrotransporte, aunque previo a la unión del receptor a sus secuencias específicas en el ADN.

El complejo hsp90•IMM•dineína en el factor proapoptótico p53

La pregunta que surge es si otros factores que están asociadas a hsp90 también requieren del complejo hsp90•IMM para su movimiento hacia el núcleo. El factor proapoptótico p53 constituye un caso interesante ya que en el 50-60% de los procesos tumorales, p53 se deslocaliza del núcleo hacia el citoplasma, en donde permanece asociado a hsp90 (39, 40). El primer paso fue determinar si los componentes del heterocomplejo que habían sido descritos para SRs también se hallaban presentes en p53 (además de hsp90). La inmunoprecipitación de p53 de extractos de células DLD-1 (carcinoma de colon humano) demostró que todas las proteínas descritas en los complejos maduros de GR también forman parte de p53 (41). Como hallazgo muy importante, cabe mencionar que las IMM y dineína fueron co-inmunoprecipitadas con p53, y que la asociación de las primeras al factor proapoptótico sigue las reglas generales de interacción antes descritas en los experimentos de reconstitución con GR. Efectivamente, la incubación de p53 inmuopurificada con RL brindó los mismos resultados que aquéllos observados en la Fig.4 con GR.

Con el fin de demostrar que luego de su activación p53 utiliza la misma maquinaria de transporte que los SRs, se utilizaron células HT29-tsp53, las que sobreexpresan establemente una mutante termosensible de p53 de ratón. Esta mutante permanece en el citoplasma cuando las células crecen a la temperatura no permisiva de 39°C (Fig.8). Cuando la temperatura se cambió a 32°C, p53 translocó al núcleo a menos que las células hubieran sido transfectadas con el dominio PPIasa de la IMM o con la subunidad p50/dinamitina de dinactina (41). Estos resultados pueban que la maquinaria molecular de transporte para p53 es la misma que la descrita para SRs. La diferencia notable en ambos sistemas es que en el caso de p53, el factor permanece en el citoplasma y no continúa moviéndose hacia el núcleo como sí lo hacen los SRs. Aquélla propiedad de p53, que es la que esperábamos observar y no vimos con los SRs, podría deberse a diferencias en el tipo de señal de localización nuclear que posee respecto de los SRs, lo que hace que éstos y no el factor proapoptótico igualmente transloquen al núcleo cuando se desensambla el transportosoma. La misma especulación es válida para el efecto inhibitorio sobre el

movimiento de SRs y p53 que hemos observado cuando utilizamos drogas que desagregan el citoesqueleto (20).

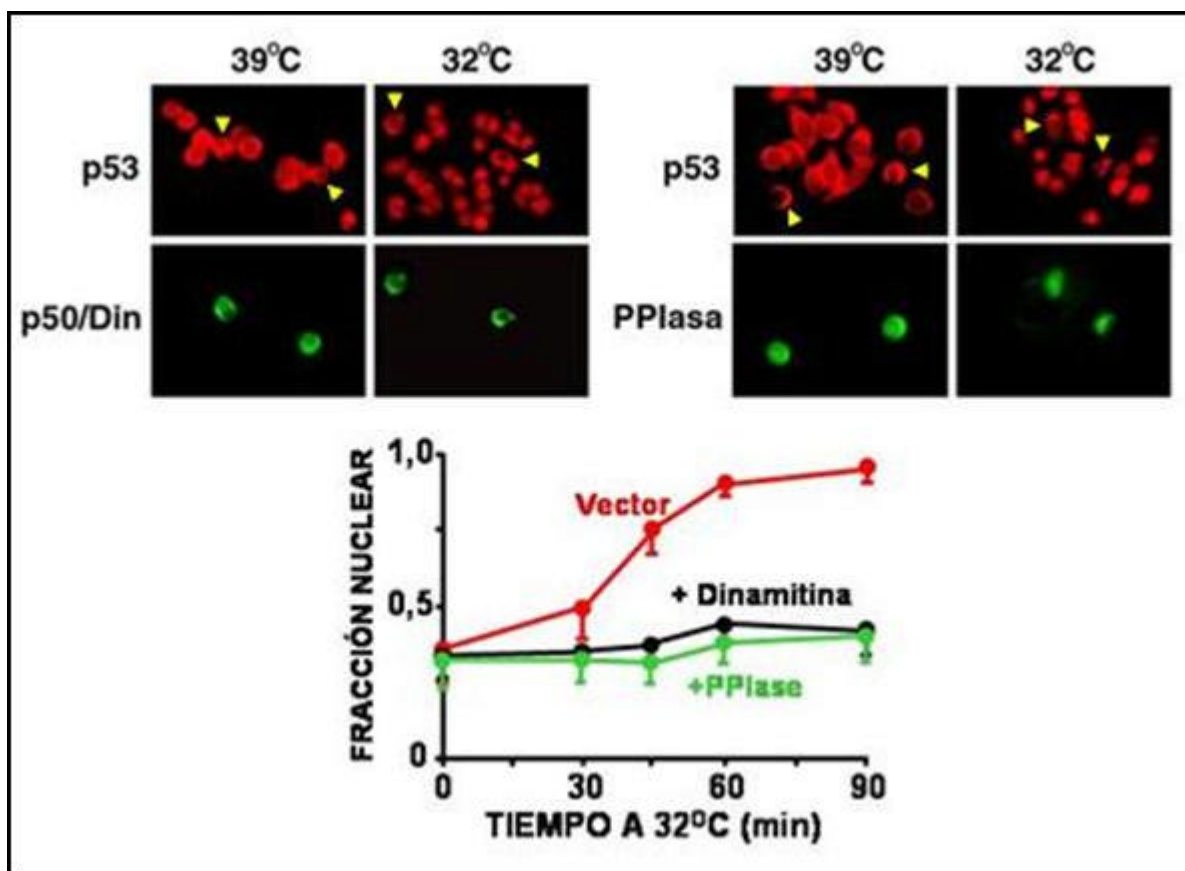


Figura 8. Inhibición de la translocación nuclear de p53

Consideraciones finales

Los resultados experimentales aquí descritos demuestran claramente que el complejo hsp90•IMM es un componente esencial de la maquinaria de transporte de factores solubles como los SRs y p53, y que dicho transporte requiere de la acción motora de dineína. Es muy probable que esta maquinaria de transporte sea utilizada por la mayoría de las proteínas que se asocian a hsp90 y/o las IMM de alto PM, pero el interrogante que aún debemos explorar es cómo se transportan aquellas proteínas que no se asocian a hsp90 y/o IMM. En estos casos ¿es la difusión una alternativa válida?

Ya hemos visto que la difusión (o el mecanismo de transporte alternativo que sea) no es ni siquiera una alternativa posible para el transporte cuando las distancias a recorrer por la proteína son grandes (Fig.7). Además, no es aún claro si el mecanismo no asistido por hsp90•IMM en células distintas a las nerviosas es relevante desde el punto de vista fisiológico.

Como expresamos anteriormente, la principal extrapolación que puede hacerse del modelo asistido de transporte aquí descrito para SRs es que, en contra de lo que se ha aceptado *à bouche ouverte* desde siempre, la unión de hormona no debería promover la inmediata disociación de hsp90 puesto que ésta es requerida para el transporte. Cuando realizamos una inmunoprecipitación de GR a partir de la fracción nuclear soluble (GR aún no asociado al ADN), encontramos que a los 10 min de incubación de las células con hormona (cuando GR es >95% nuclear), hsp90 fue recuperada con esa fracción de GR nuclear a un nivel equivalente al que se observa

hsp90 cuando se inmunoprecipita al receptor citoplasmático. Luego de 15 min ya no se recupera GR soluble en el núcleo sino unido a la cromatina, lo que sugiere que el proceso de transformación debería ocurrir en el nucleoplasma entre los 10 y 15 min de agregado el ligando.

Si poco se sabe acerca de cómo las proteínas solubles se mueven en el citoplasma, nuestro conocimiento sobre el mecanismo de movimiento de las mismas en el núcleo es casi inexistente, y hacia ese objetivo hemos dirigido una de nuestras líneas de trabajo actuales.

Agradecimientos

Los experimentos descritos en este artículo fueron financiados en parte por subsidios otorgados por la Fundación Antorchas, la Fundación Instituto Leloir, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, y la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 01-14123).

Bibliografía

1. Fabbro M, Henderson BR, 2003. Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* 282:59-69.
2. DeFranco DB, 2002. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol Endocrinol* 16:1449-1455.
3. Vicent GP, Pecci A, Ghini A, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD, 2002. Differences in nuclear retention characteristics of agonist-activated glucocorticoid receptor may determine specific responses. *Exp Cell Res* 276:142-154.
4. Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM, 2001. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol* 11:1749-1758.
5. Goldstein LS, Yang Z, 2000. Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23:39-71.
6. Toonen RF, Verhage M, 2003. Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol* 13:177-186.
7. Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R, 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:87-123.
8. Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G, Musch A, 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:233-247.
9. Pratt WB, Toft DO, 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306-360.
10. Hall D, Minton AP, 2003. Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges. *Biochim Biophys Acta* 1649:127-139.
11. Ellis RJ, Minton AP, 2003. Cell biology: join the crowd. *Nature* 425:27-8
12. Galigniana MD, Housley PR, DeFranco DB, Pratt WB, 1999. Inhibition of glucocorticoid receptor nucleocytoplasmic shuttling by okadaic acid requires intact cytoskeleton. *J Biol Chem* 274:16222-16227.
13. Galigniana MD, 2000. Functional regulation of corticosteroid receptors by phosphorylation and redox potential. *Current Topics in Steroid Research* 3:1-22.
14. Evans RM, 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
15. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.
16. Escriva H, Bertrand S, Laudet V, 2004. The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem* 40:11-26.
17. Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ, 2004. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 40:41-58.

18. Prodromou C, Pearl LH, 2003. Structure and functional relationships of Hsp90. *Curr Cancer Drug Targets* 3:301-323.
19. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G, 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 79:129-168.
20. Galigniana MD, Scruggs JL, Herrington J, et al., 1998. Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Mol Endocrinol* 12:1903-1913.
21. Galigniana MD, Piwien-Pilipuk G, 1999. Comparative inhibition by hard and soft metal ions of steroid-binding capacity of renal mineralocorticoid receptor cross-linked to the 90-kDa heat-shock protein heterocomplex. *Biochem J* 341 (Pt 3):585-592.
22. Smith DF, 2004. Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell Stress Chaperones* 9:109-121.
23. Silverstein AM, Galigniana MD, Kanelakis KC, Radanyi C, Renoir JM, Pratt WB, 1999. Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. *J Biol Chem* 274:36980-36986.
24. Davies TH, Sanchez ER, 2005. Fkbp52. *Int J Biochem Cell Biol* 37:42-47.
25. Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB, 2004. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* 16:857-872.
26. Liu J, 1993. FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol Today* 14:290-295.
27. Berg P, Pongratz I, 2002. Two parallel pathways mediate cytoplasmic localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* 277:32310-32319.
28. Galigniana MD, 1998. Native rat kidney mineralocorticoid receptor is a phosphoprotein whose transformation to a DNA-binding form is induced by phosphatases. *Biochem J* 333 (Pt 3):555-563.
29. Silverstein AM, Galigniana MD, Chen MS, Owens-Grillo JK, Chinkers M, Pratt WB, 1997. Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem* 272:16224-16230.
30. Galigniana MD, Radanyi C, Renoir JM, Housley PR, Pratt WB, 2001. Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J Biol Chem* 276:14884-14889.
31. Galigniana MD, Harrell JM, Murphy PJ, et al., 2002. Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry* 41:13602-13610.
32. Neckers L, 2002. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 8:S55-S61.
33. Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE, 2004. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 58:189-200.
34. Schroer TA, 2004. Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:759-779.
35. Burkhardt JK, Echeverri CJ, Nilsson T, Vallee RB, 1997. Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol* 139:469-484.
36. Harrell JM, Murphy PJ, Morishima Y, et al., 2004. Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *J Biol Chem* 279:54647-54654.
37. Galigniana MD, Harrell JM, Housley PR, Patterson C, Fisher SK, Pratt WB, 2004. Retrograde transport of the glucocorticoid receptor in neurites requires dynamic assembly of complexes with the protein chaperone hsp90 and is linked to the CHIP component of the machinery for proteasomal degradation. *Brain Res Mol Brain Res* 123:27-36.
38. McDonough H, Patterson C, 2003. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* 8:303-308.

39. Walerych D, Kudla G, Gutkowska M, et al., 2004. Hsp90 chaperones wild-type p53 tumor suppressor protein. J Biol Chem 279:48836-48845.
40. Muller L, Schaupp A, Walerych D, Wegele H, Buchner J, 2004. Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures. J Biol Chem 279:48846-48854.
41. Galigniana MD, Harrell JM, O'Hagen HM, Ljungman M, Pratt WB, 2004. Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus. J Biol Chem 279:22483-22489.

*Dr. Mario Galigniana,
Investigador Independiente de CONICET



Revista **QuímicaViva**
Número 2, año 4, septiembre 2005
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Las herramientas que construyeron el árbol de la vida

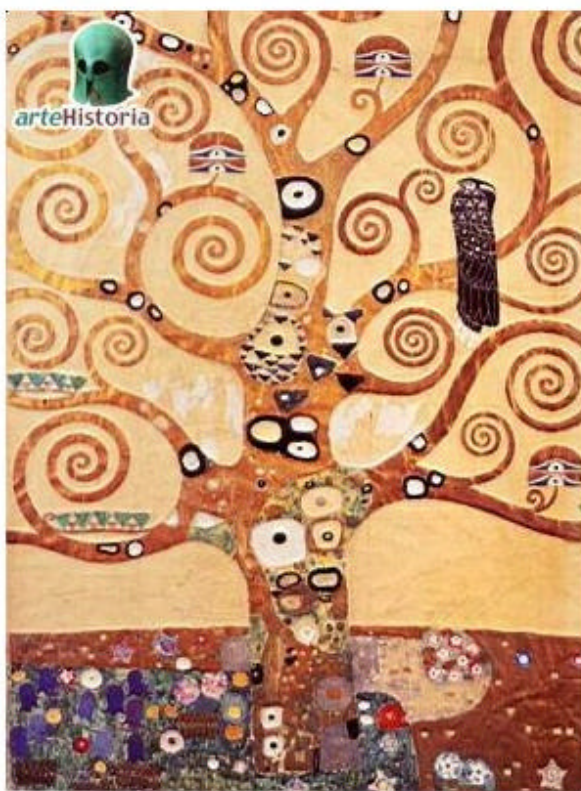
Dra. María Susana Rossi*

FIBYNE -Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- Universidad de Buenos Aires
Ciudad Universitaria, Pabellón 2. C1428EGA

Recibido 12/8/05.

Aceptado 30/8/05

Una de las características que nos distinguen del resto de los seres vivos es el lenguaje. Como parte de su mecanismo, necesitamos describir aquello que nos rodea, lo que implica asignar nombres que permitan identificar a los objetos animados e inanimados. Como consecuencia de la gran cantidad de elementos descritos, y frente a la necesidad de entender a qué nos referimos, surgen las diferentes maneras de clasificarlas. Este artículo repasa la historia de la clasificación de los seres vivos, desde los primeros intentos de ordenar los organismos utilizando un lenguaje común basado en sus propiedades, los nombres de especies latinizados binomiales propuestos por Carl von Linné (conocido como Linneo) que aún hoy se utilizan, hasta la nueva filogenia, derivada de las técnicas de biología molecular que surgieron a fines de la década del 70, que incluye a especies nunca vistas por el hombre, conocidas sólo a través de su secuencia de RNA ribosomal; su "firma" molecular.



Arbol de la vida
Pintura de Gustav Klimt
de www.artehistoria.com

Nombrar

Mucho antes que Darwin publicara, finalmente en 1859 y después de veinte años de estudio, *El origen de las especies*, libro en el que formula la teoría de la evolución por selección natural, la clasificación de las especies se establecía en base a semejanzas morfológicas. Esta fue la base de la obra monumental del botánico sueco Carl von Linné, quien, a finales del siglo XVIII, propuso una clasificación jerárquica de los seres vivos en categorías inclusivas: especie, género, familia, orden, clase, filum y reino. Carl von Linné clasificó de esta manera una enorme cantidad de especies de plantas y animales. La idea aceptada por la mayoría de los naturalistas de la época era que cada especie había sido

creada por Dios, siguiendo un “plan maestro” y, dado que intentaban entender “el plan total de la creación”, había que describir la mayor cantidad posible de especies.

En base a estas semejanzas morfológicas se establecía también la afinidad entre los ejemplares fósiles y las especies existentes. Para establecer qué caracteres era conveniente considerar en las comparaciones, así como la secuencia evolutiva de una característica en particular, es decir, establecer cuál era su condición primitiva y cuál su condición derivada, se convocaba a un especialista en el grupo de organismos en cuestión. El especialista establecía, de acuerdo a su conocimiento del grupo, las afinidades entre las especies. Esto suponía darle mucho peso al criterio de autoridad basado en la opinión de un científico consagrado. Inevitablemente, las clasificaciones tenían, entonces, una dosis alta de subjetividad.

Explicar

La teoría más conocida de Darwin es la de la selección natural, pero fue la teoría del origen común la que provocó la reacción de una parte de la comunidad científica y sobre todo de la Iglesia. En las islas Galápagos, Darwin había estudiado en detalle un grupo de especies de aves, llamadas pinzones. Analizando la distribución de las aves en las islas y sus características morfológicas y ecológicas, llegó a la conclusión de que todas las especies de pinzones de las islas Galápagos habían derivado de una única especie continental ancestral. Siguiendo ese razonamiento, otra especie más primitiva y antigua habría originado a la especie continental y finalmente a todas las especies de pájaros. En definitiva, todas las formas de vida existentes y extinguidas derivarían de un único organismo primitivo.

Plantar

En el momento en que Darwin presenta su teoría, se aceptaba que los seres vivos podían clasificarse como plantas o como animales. Sin embargo, pocos años después, el uso del microscopio puso en evidencia que muchos organismos no eran ni plantas ni animales. En 1866 el alemán Ernst Haeckel, teniendo en cuenta las observaciones y estudios de microorganismos realizados con microscopios, propone incluirlos en un nuevo grupo al que denomina protistas, y propone uno de los primeros árboles de la vida en el que divide a los organismos en tres grupos principales (figura 1). Si bien sabemos hoy que el agrupamiento que propuso Haeckel es erróneo, tienen la gran virtud de mostrar un tronco común a todas las formas de vida. El de Haeckel no fue el primer árbol utilizado para representar de las relaciones entre los organismos. La única figura que Darwin incluyó en su *El origen de las especies* fue un árbol, imagen que se contrapone a la representación de la evolución como una escalera en la que los organismos “inferiores” se ubican en los travesaños más bajos y, siguiendo una sucesión de complejidad creciente, los organismos “superiores”, en los más altos. Un árbol incorpora las dimensiones del cambio y de tiempo del proceso evolutivo y al mismo tiempo el de las relaciones ancestro-descendiente entre los organismos.

Clasificar

Hacia principios del siglo XX, la utilización de las matemáticas y la estadística en ciencia tuvo un auge muy importante. La utilización de herramientas matemáticas era considerada una garantía de objetividad. La sistemática numérica fue una escuela que agrupaba a los organismos en base al porcentaje de características morfológicas compartidas entre pares de especies o grupos de especies. Se trataba de utilizar el mayor número posible de caracteres en las comparaciones, para que el apoyo estadístico de los agrupamientos resultantes fuese mayor. Estos análisis no requerían de la opinión *a priori* de especialistas y eliminaba por lo tanto los criterios de autoridad que hasta el momento eran decisivos en las clasificaciones. El desarrollo de la sistemática numérica estuvo acompañado por un gran desarrollo de los métodos estadísticos y también de la capacidad de analizar gran cantidad de datos. Sin embargo, la comparación cuantitativa de caracteres morfológicos tiene dos limitaciones, una está relacionada con el carácter cuantitativo del análisis, tema que excede al tema de éste artículo, y la otra con el hecho de tratarse de caracteres morfológicos. Una determinada característica puede presentar diferencias dependiendo del ambiente en el que se encuentra. Un ejemplo muy conocido: la talla en humanos. Gemelos idénticos pueden tener distinta altura, dependiendo del estado nutricional durante los primeros años de sus vidas. Al estudiar las variantes de caracteres morfológicos no es claro, *a priori*, si se trata de genotipos

diferentes o de la expresión del mismo genotipo influenciado por ambientes diferentes. Los caracteres morfológicos además permiten comparaciones entre grupos cercanamente relacionados, pero es difícil encontrar una gran cantidad de caracteres morfológicos que permitan comparar simultáneamente una bacteria como *E. coli*, una bacteria termófila extrema que vive en fuentes sulfurosas de Yellowstone, un tripanosomátido, un hongo o una célula humana. La interpretación de las escasas características morfológicas comunes entre organismos tan distintos es difícil, y por lo tanto las relaciones evolutivas entre ellos no tendrían un sustento importante.

Inferir

El siguiente hito del árbol de la vida se produjo, justamente, al encontrarse caracteres válidos en las comparaciones entre todos los organismos vivos. En 1977 Woese y sus colaboradores secuenciaron los genes del ARN ribosomal de organismos tan variados como una flavobacteria, una cianobacteria, una bacteria roja, una bacteria fotosintética, bacterias Gram positivas, bacterias metanococales, termococales, metanobacteriales, un ciliado, un hongo, un animal, una planta verde, un flagelado y un microsporidio. Los genes del ARN ribosomal están presentes en todos estos organismos y, dado que gran parte de su secuencia está comprometida en la función ribosómica, es decir que están sometidos a una gran restricción en cuanto a la variación en su secuencia, han tenido una tasa de evolución muy baja, necesaria cuando se trata de formular hipótesis sobre eventos evolutivos muy antiguos, como en el caso de los primeros organismos vivos. Los trabajos de Woese y sus colaboradores encontraron que estos organismos se agrupaban en eucariotas, por un lado, y que los llamados procariotas (células sin núcleo) se dividían en dos grupos a los que llamó eubacterias y arqueobacterias, que tenían diferencias tan profundas entre sí como cada uno de ellos con los eucariotas (figura 2). Estudios posteriores que analizaron el genoma completo de una arqueobacteria confirmaron que sólo de la mitad de sus genes eran homólogos a genes bacterianos (muchos de los restantes tienen características de genes eucariotas), confirmando que se trata de un grupo claramente diferenciado de las eubacterias.

Secuenciar

La revolución de las secuencias, por llamarla de alguna manera, hizo accesible una gran cantidad de información del pasado histórico remoto de los organismos contenida en las secuencias de sus genomas. El árbol de la vida es, como todo árbol evolutivo, una hipótesis; en este caso sobre las relaciones evolutivas de los primeros organismos que existieron en la Tierra. La ventaja de analizar secuencias en lugar de los datos morfológicos de los organismos actuales para inferir las relaciones filogenéticas de los primitivos, es que sólo un 1% de los organismos que existieron en la Tierra dejaron registro fósil, por lo que no sabemos cómo estaban organizados los esquemas corporales o celulares de la mayoría de los seres vivos primitivos, ni qué aspecto tenían sus estructuras morfológicas. Tampoco conocemos, es cierto, la secuencia de sus genomas (los fósiles moleculares son menos que los dedos de una mano), pero sí podemos inferir, a partir de las secuencias de sus descendientes actuales, la existencia de sus ancestros y las relaciones entre ellos.

Evolucionar

Este árbol de la vida está en permanente construcción, y ha sufrido modificaciones cada vez que una nueva herramienta de análisis ha permitido la incorporación de nuevos datos y de diferentes enfoques. Desde la década de 1990, la capacidad de analizar genomas completos mediante secuenciación base a base, la ampliación de la capacidad de análisis informático de estas enormes cantidades de secuencias, por un lado, y los estudios de la "arquitectura" de los genomas (número y estructura de los cromosomas, posición de los genes en los cromosomas, número de copias, grado de ligamiento entre genes), por otro, permite trazar hipótesis cada vez más detalladas sobre cómo evolucionaron los primeros organismos. Este enfoque de la evolución molecular reveló que durante el período posterior a la aparición del primer organismo vivo, la transferencia de genes e inclusive de genomas completos entre los linajes (como las actuales mitocondrias y cloroplastos) entre eubacterias, eucariotas y arqueas, fue tan importante, que la representación de estos primeros eventos en la evolución

de la vida en la Tierra quizás no sea un clásico árbol bifurcante, sino más bien uno muy particular, una red de linajes promiscuos.

El propósito de los biólogos evolutivos no es clasificar los organismos, eso viene por añadidura. El objetivo de los biólogos evolutivos es reconstruir la historia de la vida en la Tierra, entender qué transformaciones sufrieron los genes, las estructuras, los esquemas corporales, y los linajes orgánicos, cómo y cuándo ocurrieron. Necesitamos contar con una hipótesis acerca de las relaciones filogenéticas entre los organismos para poder analizar este complejo entramado de procesos operando desde el nivel molecular al planetario. La pregunta sobre quién desciende de quién tiene un árbol filogenético por respuesta, y sólo sobre esta base se puede establecer una clasificación natural. Finalmente, nunca tenemos que olvidar que los árboles filogenéticos no son hechos, son sólo hipótesis, por lo tanto, nuevos, más y mejores datos, así como la experimentación de mejores métodos para analizarlos, permiten aumentar la calidad de la hipótesis, la vieja teoría darwiniana del origen común de todos los seres vivos.

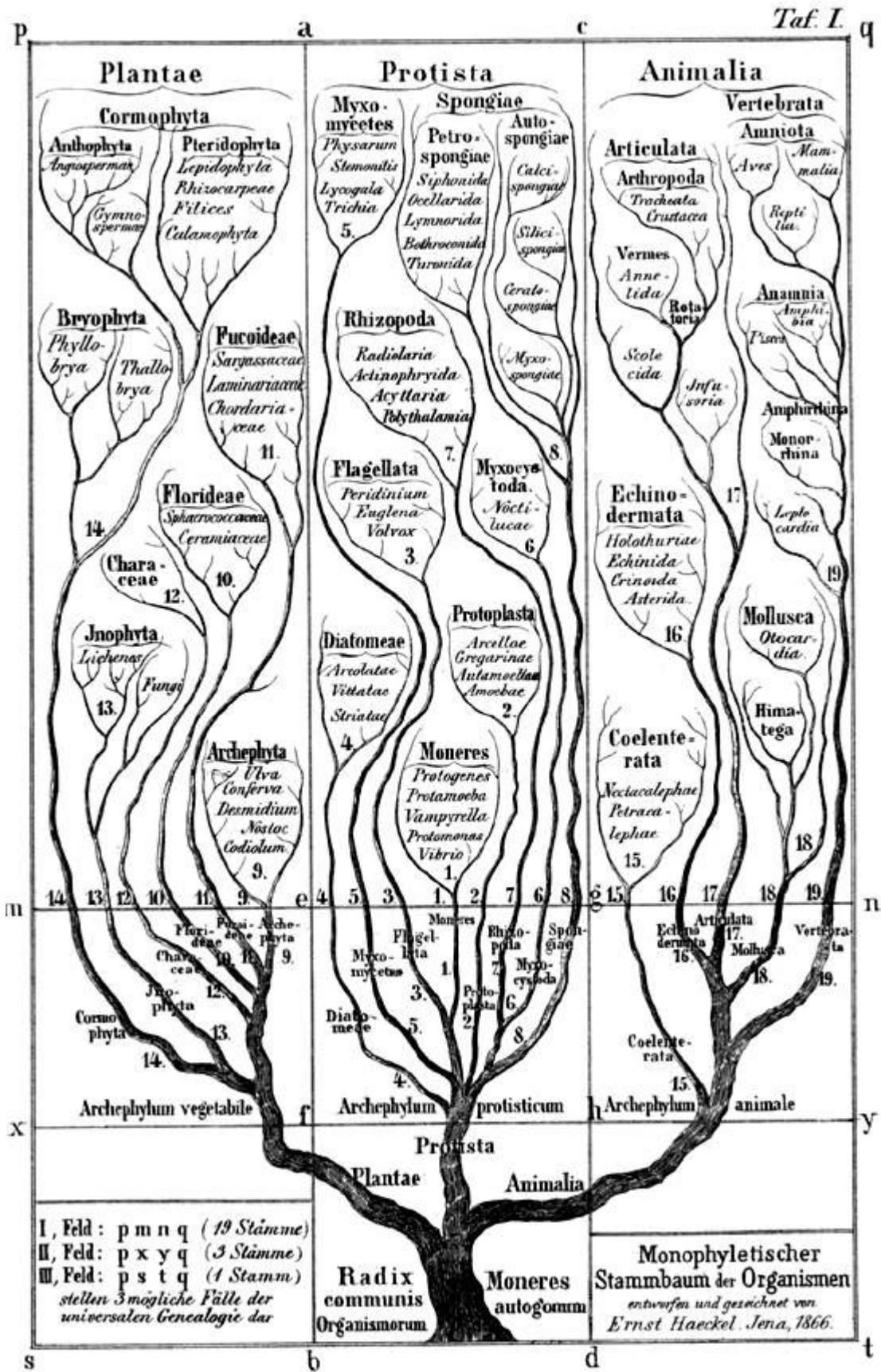


Figura 1. Árbol de la vida propuesto por Haeckel, en 1866, en base a los estudios de microscopía que lo llevaron a crear un nuevo grupo, los protistas, en el que incluía a las bacterias, los protozoarios, algunas algas y hongos.

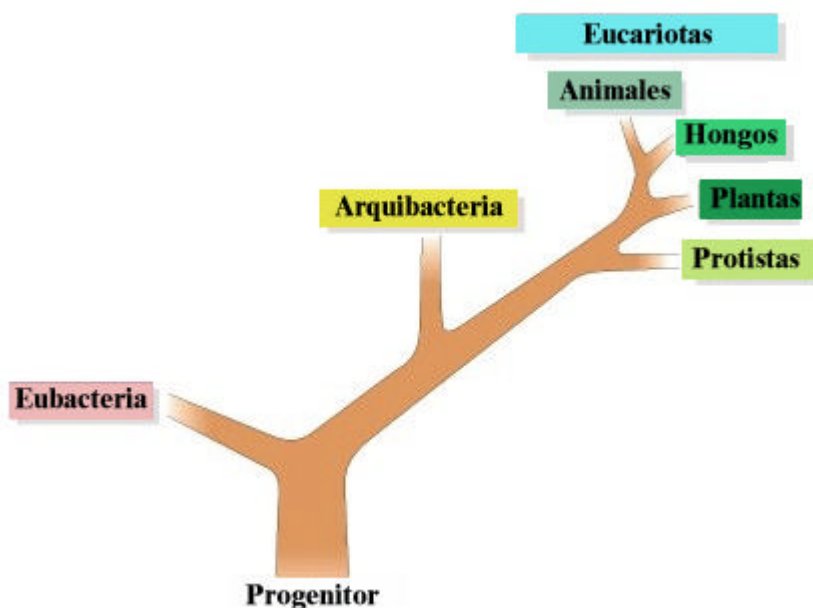


Figura 2. Árbol de la vida propuesto por Woese en 1979, en base a las secuencias de los genes de ARN ribosomal. Este árbol pone en evidencia que el agrupamiento de todas las bacterias dentro de grupo procariota no refleja las relaciones evolutivas entre ellas, y propone la división de los antiguos procariotas en dos nuevos dominios las bacterias y las arquibacterias.

Bibliografía

Hillis, D. M., Moritz, C. y Mable, B. K (editors). 1996. Molecular Systematics. 2nd edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts. (Incluye explicaciones técnicas acerca de cómo obtener datos moleculares y los fundamentos teóricos de los algoritmos utilizados para analizarlos).

Mayr, E. 1982. The grow of biological thought: diversity, evolution and inheritance. Harvard University Press, Cambridge, M. A. (Historia de la sistemática).

Page, R. D. and Holmes, E. C. 1998. Molecular evolution: a phylogenetic approach. Blackwell Science. (Un abordaje riguroso pero sencillo de las metodologías de construcción de árboles y redes, en base a datos moleculares, aplicados a variados problemas de biología evolutiva)

* Dra. María Susana Rossi
Investigadora del CONICET

 **QuímicaViva**
ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**
Número 2, año 4, septiembre 2005
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar