

El aporte de la lingüística a la comunicación de la ciencia

Por **Susana Gallardo**

Guiomar Ciapuscio se doctoró en Lingüística, en la Universidad de Bielefeld, Alemania. Es investigadora independiente del Conicet, y profesora asociada de la cátedra de Gramática en la Facultad de Filosofía y Letras de la Universidad de Buenos Aires. Su área de investigación es la Gramática y la Lingüística del Texto, y dirige proyectos del programa UBACyT y Conicet que se centran en el estudio del texto académico-científico. Además de numerosos artículos publicados en revistas nacionales e internacionales, ha escrito el libro *Tipos textuales* (Eudeba) así como *Textos especializados y terminología*, editado en Barcelona por la Universidad Pompeu Fabra.



QV. ¿Dentro del amplio campo de la lingüística, cuál es el área específica de su trabajo?

GC. Mi área de trabajo es la Gramática y la Lingüística del texto. El interés por dilucidar la naturaleza y funcionalidad de ciertos fenómenos lingüísticos se combinan, en mi caso, por una fuerte inclinación a estudiarlos en contextos de uso especializados, es decir, en mi grupo trabajamos con distintos tipos o géneros de textos que provienen del campo científico, tanto escritos como orales.

QV. ¿Por qué el interés por lo que se denomina “texto especializado”?

GC. A mi juicio, el texto especializado presenta un territorio especialmente fértil para el estudio de distintas problemáticas lingüísticas, como las estructuras argumentativas y explicativas, las terminologías y la definición, los procedimientos metalingüísticos en general, determinados espectros de verbos, como los modales, por ejemplo, entre otras cuestiones.

QV. Perdón, ¿podría explicar qué son los procedimientos metalingüísticos?

GC. “Metalingüístico” se refiere al lenguaje que se emplea para hablar del lenguaje. Dado que en los textos científicos, en especial en los divulgativos, las palabras generales de la lengua común coexisten junto con terminologías especializadas, muchas veces se comentan, se definen o se explican los términos que se emplean. Estas operaciones metalingüísticas, que para nosotros son muy interesantes, no se dan con la misma intensidad y riqueza en otros tipos de textos.

QV. ¿En qué puede mejorarse o beneficiarse la actividad de la comunicación de la ciencia a partir de las investigaciones lingüísticas que se están realizando?

GC. Indudablemente los resultados que proveen las investigaciones lingüísticas pueden emplearse para la capacitación y el mejoramiento de las prácticas orales y escritas de los científicos, tanto en su lengua materna como en lenguas extranjeras. Por ejemplo, desde los años noventa se vienen realizando muchísimas investigaciones en las áreas de la lingüística textual y la lingüística aplicada sobre distintos géneros del discurso científico, como el *paper*, la reseña crítica, la conferencia. Especialmente en inglés, por su lugar absolutamente dominante en la ciencia actual. Pero también en algunas lenguas como el alemán, el español, el francés que, al menos en determinadas disciplinas, resisten el embate anglosajón.

QV. ¿Esos estudios han producido resultados?

GC. Sí, por supuesto. Muchos de ellos han permitido conocer a fondo las particularidades retóricas y lingüísticas de esos géneros que son fundamentales en la práctica científica. Un escritor o un hablante informado y consciente de esas características esenciales producirá, sin lugar a dudas, textos de mayor calidad y, por ejemplo, tendrá mayores chances de que estos sean aceptados en revistas de circulación internacional con altas exigencias no solo en cuanto a calidad de la investigación sino también en cuanto a forma lingüística y retórica.

QV. ¿Hay grupos en el país, además del suyo, que trabajen en estos temas?

GC. Sí, existen varios proyectos en desarrollo en el país que realizan rigurosos estudios sobre el artículo de investigación, la reseña crítica, los *peer review*. Por ejemplo, hay un grupo de la Universidad de Cuyo que está estudiando el artículo de investigación en inglés de distintas disciplinas; sobre esa base está elaborando un programa de redacción asistida para facilitar la tarea de investigadores argentinos que deben escribir en inglés. Se llama Grupo Redacte.

QV. Un nombre muy apropiado.

GC. Además, los resultados de la investigación lingüística sobre las terminologías científicas también permiten otros desarrollos aplicados, como diccionarios y glosarios especializados que recopilan y sistematizan las terminologías de las distintas disciplinas, glosarios de equivalencias para apoyo a la labor de traducción e interpretación, etc.

QV. En el ámbito de las ciencias exactas, las llamadas ciencias duras, no siempre se conocen, porque tampoco llegan a la prensa, las investigaciones que se realizan en el área de las humanidades. En tal sentido quisiéramos que nos cuente qué investigaciones se están haciendo en su disciplina, es decir, en el dominio de la lingüística.

GC. Bueno, la pregunta es muy amplia. De hecho, la lingüística es una disciplina compleja, dado que su objeto, el lenguaje, también lo es. Confluyen dentro de la lingüística intereses muy diversos: líneas que podríamos definir con la controvertida metáfora que se aplica para clasificar las ciencias en general, “duras” y “blandas”, con la conciencia de que también en lingüística su empleo es controvertido.

QV. Empecemos por las duras.

GC. Por un lado, las lenguas naturales, pueden verse como sistemas de elementos, de un elevado nivel de complejidad, compuestos por subsistemas –el morfológico y el sintáctico, pero también el fonológico y el semántico– cuyas unidades específicas se combinan a partir de conjuntos de reglas particulares de cada subsistema. De esta manera, las lenguas son complejos mecanismos que pueden desentrañarse y describirse a partir de modelizaciones que intentan no sólo representarlos sino también explicar sus principios de funcionamiento y su potente capacidad creativa. En este sentido, puede hablarse de una

línea muy amplia de investigaciones que se describen con el rótulo de “Lingüística Formal”. Dentro de esta línea el paradigma dominante sin lugar a dudas es la Gramática Generativa, que surge a partir de la obra de Noam Chomsky, desarrollada a partir de 1957.

QV. ¿Qué postula esta teoría?

GC. La teoría de Chomsky postula la existencia de una gramática universal, en el sentido de un conjunto de principios y parámetros que serían patrimonio común de la especie, de carácter innato, cuyos valores específicos se “fijan” o establecen a partir del *input* de la experiencia, el contexto lingüístico en que el niño nace. De manera que sus estudios acerca de la competencia lingüística, orientados a descifrar la particular combinatoria de cada lengua natural –en sus distintos módulos- a partir de los postulados generales de carácter universal, están ligados a una explicación o teoría de la adquisición lingüística. Desde este punto de vista no pueden dejar de mencionarse los vínculos de esta línea de pensamiento con los estudios de la neurobiología del lenguaje, que tan eficazmente ha hecho conocer Steven Pinker, investigador del MIT, en sus distintos libros. En especial, *El instinto del lenguaje*.

QV. ¿Y cuáles son las teorías que se oponen a esta, o que admiten la denominación de “blandas”?

GC. Se trata de la gran línea, que suele describirse como “funcionalismo”, y que alberga distintas direcciones de la lingüística. En términos muy generales, se proponen explicar cómo se emplean las lenguas en contextos naturales de uso por hablantes concretos. Así encontramos estudios gramaticales y lingüísticos que focalizan sus trabajos en determinar qué tipo de estructuras o elementos se emplean para alcanzar determinados fines o por qué determinado tipo o género de textos hace un empleo intensivo de determinado tipo de recursos. Los resultados de estos estudios, naturalmente, pueden emplearse para capacitar y entrenar en la escritura de textos para distintos propósitos específicos. Y también en géneros orales institucionalizados, como entrevistas de trabajo, conferencias públicas, consultas de asesoramiento, entre otros.

QV. ¿Hay líneas de trabajo interdisciplinarias?

GC. Sí, claro. Hay todo un grupo de estudios que se denominan “lingüística de guión”, o más tradicionalmente la “translingüística”, que son la sociolingüística, la etnolingüística, la psicolingüística, la lingüística histórica, entre otras. Aquí se emplean los conocimientos de la lingüística para explicar problemas vinculados con temáticas de disciplinas vecinas. La sociolingüística, por ejemplo, se pregunta acerca de qué variedades lingüísticas emplean determinados grupos sociales, cómo se constituyen grupos mediante la lengua, de qué manera la lengua aporta a la discriminación y el rechazo del “otro”, qué papel juegan y cómo sobreviven las lenguas minoritarias, etc.

QV. ¿Entonces la lingüística sería una especie de “megaciencia”?

GC. Sin duda. Por un lado, se desarrollan investigaciones de tipo formal, con sofisticadas modelizaciones del sistema lingüístico y herramientas de la lógica y la matemática, que conciben “la lengua” como un objeto de laboratorio, es decir, “in vitro”, aislado de su uso en contextos reales. Por otro lado, una importante corriente está representada por investigaciones de orden funcional, que emplean los insumos de la pragmática, la sociología, la psicología, la historia cultural, y que definen la lengua principalmente desde el punto de vista del uso por parte de hablantes en el marco de contextos marcados social y culturalmente, es decir, como un objeto “in vivo”.

QV. Una preocupación de algunos científicos es la contaminación con el inglés que se observa en trabajos escritos en español, y no sólo por la inclusión de palabras inglesas, sino también porque se adoptan las estructuras del inglés. Por ejemplo el uso de los adjetivos siempre adelante del sustantivo, o ciertas formas verbales, como las pasivas. ¿Cuál es su opinión al respecto?

GC. La preocupación es genuina, claro está, se trata de transferencias no deseadas que el individuo realiza debido a que, por su actividad, está muy inmerso en la lengua extranjera. Por otra parte, ese fenómeno, absolutamente usual y general en personas bilingües o plurilingües, creo que puede verse acentuado en el caso del inglés y el español científico por cuestiones vinculadas al tema del “prestigio lingüístico” y las valoraciones sociales de las lenguas. Es posible que, en muchos científicos, la convicción absoluta de la mayor importancia del inglés, en tanto la lengua de la ciencia respecto del español, lleve a cierta ligereza a la hora de elegir la mejor expresión lingüística cuando escriben en español.

QV. Así como ciertos grupos étnicos, por ejemplo los quechuas, defienden su identidad a través de su idioma y costumbres ¿deberíamos nosotros defender nuestra identidad aunque entendamos que para comunicarnos con el resto del mundo podemos usar un idioma diferente?

GC. Creo que esta es una de las temáticas actuales más interesantes en la reflexión sobre el discurso científico-académico; la pregunta acerca de si es inevitable que el inglés sea la lengua exclusiva de las ciencias; qué papel cumplen las lenguas vernáculas de los investigadores no angloparlantes; o si es posible que todas las ciencias –naturales, sociales y humanidades- finalmente lleguen a publicar sus resultados solo en inglés. Estos procesos lingüísticos que llevan a la dominancia de una lengua, y a la declinación de otras, son muy complejos y responden a causas muy diversas. Pensemos en el caso del latín y el griego, como lenguas científicas exclusivas durante siglos, y su declinación y reemplazo a causa del nacimiento de las naciones europeas y la jerarquización de sus lenguas vernáculas en los siglos XVI y XVII. Y los importantes procesos de adaptación y normalización lingüísticas para dotar al alemán y al francés de terminologías adecuadas para la expresión de los conceptos científicos, a partir de las disponibilidades y capacidades de su morfología y su léxico...

QV. Es decir que una política lingüística puede influir en la dirección que a veces toman los hechos históricos.

GC. Sin duda. Tenemos el caso de las lenguas reprimidas o censuradas por largo tiempo, como el catalán, durante la etapa franquista: solo cuando las condiciones socio-políticas y económicas permitieron la puesta en marcha y ejecución de una política lingüística firme de revitalización y ampliación léxica, el catalán comenzó a ser una lengua idónea para los intercambios en ámbitos no cotidianos o familiares, como por ejemplo el ámbito científico.

QV. Entonces ¿es positivo o negativo este dominio que tiene el inglés en el discurso científico?

GC. Disponer de una “lingua franca”, como el inglés, para las interacciones y discusiones en las distintas disciplinas, especialmente, en las ciencias naturales y experimentales, es, sin lugar a dudas, un hecho positivo que permite que investigadores hablantes de lenguas extremadamente lejanas entre sí puedan intercambiar, discutir y producir nuevos conocimientos. Sin embargo, en otras disciplinas, si bien el inglés es un recurso valioso para la comunicación con los colegas, la diversidad lingüística y la producción en la lengua original puede ser una necesidad intrínseca al ámbito de conocimiento mismo, como la literatura y la lingüística. Pienso que siempre es más interesante e inteligente tender a la diversidad –es decir, al bilingüismo o al polilingüismo de los investigadores y académicos– que aceptar lo único, el monolingüismo, sea cual sea la lengua del investigador.

QV. ¿Hay alguna iniciativa en el ámbito académico que tienda a la defensa del español?

GC. Conozco algunas iniciativas novedosas, en este sentido, como la de un grupo de investigadores de la filosofía de la UBA que han formado asociaciones de filósofos latinoamericanos, una de cuyas banderas fundamentales es defender el uso del español. Para contrarrestar el evidente avance del inglés

en su disciplina, por ejemplo, han decidido que todos los congresos de la asociación que se realizan en nuestro continente tengan como lengua de las presentaciones y discusiones el español.

QV. ¿Cómo se encuentra el desarrollo de la lingüística en la Argentina en relación con el primer mundo?

GC. Calificaría el desarrollo de la lingüística en el país como digno. Desde la recuperación de la democracia, la lingüística, como otras disciplinas sociales y humanísticas, ha recibido el apoyo de distintas instituciones públicas y privadas. Entre ellas la Fundación Antorchas, que tempranamente apoyó el desarrollo de la disciplina con distintas becas y subsidios. Ya tenemos una decena de lingüistas formados en importantes centros de Europa y Estados Unidos, varias decenas de doctores en lingüística que realizaron sus doctorados en el país y también especialistas que surgieron de las distintas maestrías y carreras de especialización que existen hoy en varias universidades nacionales. Hay grupos de investigación valiosos que trabajan en distintas corrientes de la lingüística en las principales universidades del país y en los institutos de investigación, sin lugar a dudas. Puede decirse que junto con preocupaciones de índole básica que caracterizan a algunos grupos de investigación valiosos (en las universidades de Buenos Aires, Comahue, Cuyo, Bahía Blanca) son numerosos los equipos que tienen una fuerte vocación aplicada, con preocupaciones de índole social: problemas de lectura y comprensión de textos, didáctica de la lengua, alfabetización, producción de textos académicos, entre otras.

QV. ¿Qué problemas fundamentales encuentra en la comunicación de temas científicos que se realiza en la prensa escrita?

GC. He sido una observadora atenta de la divulgación de temas científicos que se hace en la prensa de la Argentina a partir de mediados de los años ochenta. Y debo decir que constato desde hace ya unos años una mejora importantísima en la calidad de los textos divulgativos. Los primeros "cables" de divulgación, que se caracterizaban por un formato excesivamente rígido y una progresión de contenidos repetitiva y previsible, se ven hoy felizmente superados por textos más flexibles, atractivos e interesantes, que se acompañan con variados dispositivos visuales. En ese sentido es claro que las distintas experiencias en la formación de periodistas científicos realizadas en el país desde la recuperación democrática han dado frutos importantes.

QV. Un problema generalizado, que la divulgación científica trata de atenuar, es el desconocimiento general de la sociedad respecto del papel que juega la ciencia. ¿Considera que esto es aún más notorio en las ciencias sociales y las humanidades?

GC. Aquí podría remitirme a un lingüista alemán, Harald Weinrich, que ha planteado una interesante diferencia entre las ciencias naturales y las sociales. Según él, mientras que las ciencias naturales y experimentales tienen un frente de investigación claro, saben perfectamente dónde está "el enemigo" que no es otro que la ignorancia, las ciencias sociales y humanas sufren la falta de un frente de investigación preciso. Por lo tanto, de esta afirmación podría seguirse que los descubrimientos y avances en las primeras son sucesos diáfanos, victorias parciales sobre la ignorancia, que en muchas ciencias tienen consecuencias directas sobre la vida y la salud de las personas y del planeta. Y por ende son motivo indudable de mayor difusión periodística. Las ciencias sociales y las humanidades tienen mayores dificultades para producir acontecimientos de estas características.

QV. Algunos consideran que, en realidad, los medios tienen ciertos prejuicios a la hora de considerar estas disciplinas como científicas.

GC. Puede ser, habría que indagarlo. Sin embargo, creo que sería muy importante incorporar, en todos los casos, la mirada científica en el tratamiento de los distintos temas periodísticos como los de índole económica, social, política, que son parte del interés común. La ciencia siempre tiene algo que decir

sobre los distintos problemas o asuntos que el periodista expone en la prensa general: me parece que ese es el punto, insistir con la presencia en los medios de los temas científicos en que la investigación científica siempre, de una u otra manera, es útil a los problemas de la sociedad.



Revista **QuímicaViva**
Número 3, año 4, diciembre 2005
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



Revista **QuímicaViva**
Número 3, año 4, diciembre 2005
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Luces y sombras de la vacuna antipoliomielítica

Dra. Celia E. Coto*

Laboratorio de Virología. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. Pabellón 2. Piso 4.
C1428EGA.Capital Federal. Argentina.
virocoto@qb.fcen.uba.ar

Recibido: 17/11/2005

Aceptado: 1/12/2005

Luces y sombras

En abril de 2005 se cumplió el quincuagésimo aniversario del licenciamiento de la primera vacuna contra el virus polio creada por Jonas Salk en la Universidad de Pittsburgh, Estados Unidos (1). La vacuna antipoliomielítica inactivada (VPI), conocida también con el nombre de vacuna Salk, consiste en una suspensión incolora estéril que contiene los tres serotipos del virus polio (I, II y III) inactivados con formaldehído. La vacuna se preparó originariamente en cultivos primarios de riñón de mono *Rhesus*. Los ensayos clínicos comenzaron en 1954, en plena epidemia de poliomielitis, y los resultados entre los grupos de voluntarios fueron tan efectivos, que el gobierno autorizó, en tiempo récord, su aplicación masiva.

Para tranquilidad de los lectores de este artículo, aclaremos que en 1987 se obtuvo una versión más potente de esta vacuna, más antigénica, y preparada en cultivos de células humanas. Se sabe que la forma potenciada de la vacuna induce altos títulos de anticuerpos después de dos dosis y “seroconvierte” al 94-100% de los vacunados, mientras que la aplicación de tres dosis “seroprotege” casi al 100%. La inmunización impide que el virus pueda arribar, en caso de infección, al sistema nervioso central y produzca parálisis. La inmunidad persiste por muchos años y, aunque no hay una protección del tracto intestinal, no induce IgA. De hecho, países como Suecia, Finlandia, Holanda, Noruega, Islandia y Canadá están libres del virus polio sólo por la vacunación con VPI.

En 1958, Albert Sabin desarrolló una vacuna atenuada contra el virus polio, conocida como vacuna oral (VOP). Esta vacuna se obtuvo atenuando las cepas salvajes del virus por medio de pasajes sucesivos de cada uno de los serotipos en células epiteliales de riñón de mono. La forma oral comúnmente usada de esta vacuna es trivalente, lo que significa que contiene los tres serotipos virales. A diferencia de la IPV y, puesto que son virus atenuados, multiplican en el intestino e inducen inmunidad en forma similar a la infección natural, la diferencia radica en que la atenuación consiste en que los virus que contiene no son neurovirulentos, lo que se demuestra por inyección intraespinal en primates. La vacuna tiene la ventaja de su administración oral y no subcutánea, como la IPV. Asimismo, produce protección

del epitelio gastrointestinal e inmunidad de por vida. Por esa razón, y por resultar más económica, muchos países la adoptaron en forma inmediata, sobre todo Rusia, país donde la vacunación fue masiva. La persona vacunada excreta virus en las heces por varios días y, aunque hay una probabilidad cierta de que el virus eliminado se vuelva virulento después de varias rondas de replicación intestinal, no resulta peligroso para el entorno, siempre y cuando las personas que están en contacto con un niño vacunado estén inmunizadas.



Debido a que la vacuna oral es una mezcla de virus atenuados, la replicación exitosa de uno de los serotipos interfiere con los otros dos, de modo tal que, para lograr inmunidad contra las tres clases de virus polio patógeno, es necesario administrar tres dosis. Si bien esta situación trae problemas en cuanto a la completud del esquema de vacunación, no es esa la dificultad más grave asociada a la vacuna. Los CDC * (2) de los Estados Unidos estiman que, a pesar de la atenuación del virus, por cada 2,5 millones de dosis se produce un caso de poliomiелitis parálitica asociado a la vacuna (PAV). El riesgo aumenta para los niños cuando reciben la primera dosis, éste se estima en 1 caso cada 790.000 dosis y para los niños que viven en países del tercer mundo, debido a la desnutrición e inmunodeficiencia, el riesgo asciende a 1 caso entre 520.000 vacunados.

Con estas herramientas imperfectas y la férrea voluntad mancomunada bajo la denominación: "Iniciativa para la erradicación global de la polio", patrocinada por la OMS (Organización Mundial de la Salud), UNICEF, el Rotary Internacional y los CDC, llegamos a noviembre de 2005 con datos optimistas. El informe provisto por los mencionados organismos destaca una reducción del 99% en el número de casos de poliomiелitis entre 1988 y el 1º de noviembre de 2005. Traducido en números: de 350.000 casos anuales en 1989 se ha pasado a un presente de 1.469. Todavía hay seis países que se consideran endémicos para polio en los que están presentes los serotipos I y III que son Nigeria, India, Pakistán, Afganistán, Niger y Egipto. Pero el virus polio (el vacunante o el salvaje) no se da por vencido y ha reaparecido en países ya declarados libres de la enfermedad. Un total de once países fueron re infectados en el período 2004 a 2005, ellos son Somalia, Indonesia, Yemen, Angola, Etiopía, Chad, Sudán, Malí, Eritrea, Camerún y Nepal (3). Que esto ocurra en los países mencionados aflige pero no sorprende, lo que inquieta es la aparición de cuatro casos de poliomiелitis en niños de una comunidad Amish en Minnesota, EE.UU. La noticia trascendió a la prensa el mes de octubre

pasado. Las autoridades sanitarias señalan que se trata de la introducción del virus entre los Amish por una persona vacunada en otro país (4). Dado que la comunidad religiosa protestante involucrada se niega a vacunarse, no se descarta la aparición de un brote. Precisamente, el último brote de polio en los Estados Unidos ocurrió en 1979, también en una comunidad Amish. Desde entonces los americanos se consideraron libres del virus y, debido a los accidentes con la VOP, ocho casos paralíticos al año, también dejaron de usar esta vacuna y desde 2000 sólo utilizan la VIP para inmunizar.

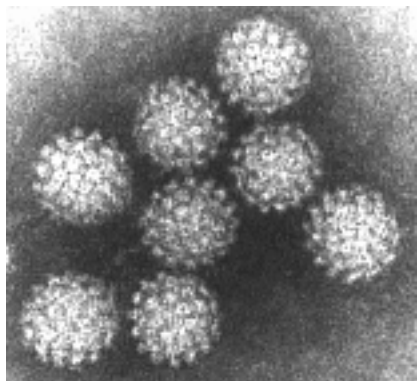
Hasta aquí los hechos. Las autoridades sanitarias deberían estar muy alertas ante este episodio de reintroducción, que no parece ser un fenómeno único de los países pobres.

Las dudas que dejaron los primeros lotes de vacuna

Quizás el concepto generalizado, predominante en la época en que se desarrolló la vacuna contra el virus polio, de que los virus eran todos citolíticos, impidió sospechar la presencia de otro agente viral en los cultivos de células de mono que fueron usados para obtener la VIP y la VOP. Ni el uso del formaldehído, eficiente para inactivar al virus polio en la VIP, logró eliminar por completo al virus contaminante SV40 por ser más resistente que aquél, Por lo tanto, fue suministrado con su capacidad intacta para replicar en muchos niños vacunados. ¡Qué decir de los primeros lotes de la vacuna VOP que no sufrían proceso alguno de inactivación! Se calcula que en el período que va de 1955 a 1963 las vacunas contra el virus polio habían sido administradas a un estimado de 100 millones de personas. Recién a partir de 1963 el virus SV40 fue eliminado de las vacunas, aunque para el período mencionado fue dispersado también en la población por otras vacunas. Así, desde enero de 1959 hasta diciembre de 1961, todos los varones ingresantes al ejército de los Estados Unidos, varios miles, recibieron por vía parental una vacuna contra Adenovirus 3 y 7 preparada en células de mono que contenían SV40. Lo más notable de este caso es que, según se supo más tarde, el adenovirus no puede replicar en esas células si no está presente el SV40, de modo que la infección mixta dio lugar también a ADN virales híbridos (5).

Luces y sombras

El virus SV40 es un virus icosaédrico de tamaño pequeño, alrededor de 55 nm, cuyo ADN es doble y circular, y pertenece al género papilomavirus de la familia *Papovaviridae*. Su nombre en inglés (simian virus 40) es un acrónimo formado por S (por su procedencia de los simios), V (porque forma vacuolas en el citoplasma celular) y 40 (fue el aislamiento número 40) a partir de cultivos primarios de riñón de mono. Su presencia se manifestó por la vacuolización extensa del citoplasma de las células (6).



Microscopía electrónica de partículas de virus SV40 visualizadas por tinción negativa.

En forma inmediata a su descubrimiento, el virus SV40 demostró su potencial oncogénico para producir tumores en ratones y hámsters y transformar muchos tipos de células en cultivo, incluso las de origen humano. El virus se pudo aislar también de algunos lotes de vacuna, razón por la cual, se instaló en el mundo científico el angustioso interrogante sin respuesta definitiva aún ¿el virus SV40 podrá producir cáncer en el hombre?

Desde su aislamiento en 1960 el virus SV40 se convirtió en uno de los virus más estudiados, y se constituyó en una herramienta de vital importancia en el desarrollo de la biología molecular. Una de las proteínas no estructurales del SV40 es la conocida también como antígeno T u oncoproteína, que es esencial para la replicación del virus y que afecta al ciclo de la célula donde éste se aloja. Entre todos los adelantos científicos promovidos por el estudio con SV40 se destacan: 1) fue el primer ADN eucariótico completamente secuenciado, 2) permitió el reconocimiento de sectores del ADN que actúan en calidad de *enhancers* o estimuladores de la síntesis de ADN, 3) permitió identificar algunos pasos de la replicación del ADN eucariótico y explicar el fenómeno de *splicing* alternativo, 4) saber de la necesidad de una transcripción continua de una proteína viral no estructural para el mantenimiento de la transformación, 5) la identificación de proteínas supresoras de tumores como la p53 y RB 6) conocer el efecto de los virus ADN sobre la regulación del ciclo celular, 7) identificar la presencia de señales en las moléculas de proteínas que determinan su localización nuclear (7).

El virus SV40 tiene como huésped a varias especies de monos en las que no causa daño aparente a menos que esté acompañado por el virus SIV (virus de la inmunodeficiencia del simio). En realidad los investigadores se preguntan de dónde proviene la infección del hombre con este virus, ya que se lo ha detectado, en muchos casos, en personas que no habían recibido la vacuna contaminada. Hay otros dos papiloma virus parecidos al SV40 que son de origen humano y que se conocen con el nombre de BK y JC respectivamente. Dado que el ADN del virus BK tiene un 70% de homología con el virus SV40, comparten antígenos. Casi todas las personas portan anticuerpos contra el virus BK, cuya capacidad para enfermar se desconoce. Los estudios que involucran anticuerpos pueden complicarse porque se ha comprobado que entre los tres virus hay reacciones de inmunidad cruzada (8).

Sombras: los tres períodos

Durante un período aproximadamente de 40 años después de la administración de las vacunas contaminadas, la búsqueda de evidencias epidemiológicas para probar una mayor

incidencia de cáncer entre los grupos de vacunados que recibieron SV40 fue infructuosa. Estos estudios se realizaron en diferentes países del mundo y fueron muy numerosos, no obstante, no se pudo comprobar que la aparición de cáncer fuera debida al virus, ni aún en aquellas personas que poseían anticuerpos neutralizantes contra el mismo. Se podría afirmar sin ambages que las autoridades sanitarias respiraron con alivio (9). Pero, la implementación de técnicas sensibles como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la detección de secuencias genómicas virales en tejidos provenientes de tumores, en la década del 90, puso de vuelta en la vidriera las inquietudes respecto de la relación del virus SV40 y el cáncer. Entramos así en un segundo período alarmante de por sí, que se extendió prácticamente hasta el año 2001-2003. Secuencias del ADN del virus SV40 o huellas de la presencia del antígeno T aparecieron en distintos tipos de cánceres tales como mesoteliomas pulmonares, epindemomas de cerebro o del plexo coroideo, osteosarcomas y por último en linfomas no-Hodgkin (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). La bibliografía al respecto es muy abundante y no podemos consignarla aquí en su totalidad.

A pesar de las abrumadoras evidencias, y debido a que algunos laboratorios no pudieron encontrar rastros del virus en tumores similares, en 1997, se creó un "Grupo internacional de trabajo para el estudio del virus SV40" para evaluar la relación entre este virus y el cáncer. Sus conclusiones sin definición a favor o en contra se pueden conocer en la referencia 17.

Fue hacia 1862 cuando Robert Koch, el descubridor del bacilo de la tuberculosis, dio a conocer una serie de condiciones que se deben aplicar a un microorganismo para poder concluir que es el agente causal de una determinada enfermedad. Estas condiciones que pasaron a la historia con el nombre de **postulados de Koch** establecían que el microorganismo aislado de un tejido o fluidos de un enfermo con cierta patología debería reproducir en un modelo animal la misma patología, lo que implica el aislamiento del microorganismo vivo, su cultivo y posterior inoculación. Estos postulados encorsetaron la microbiología por más de un siglo hasta que las técnicas moleculares para detección de ácidos nucleicos, entre otras, han ido minando la inmovilidad de estos férreos principios y ya para la década del 90 aparecieron trabajos que discuten la reconsideración de los postulados de Koch.

Este sería el caso del virus SV40, ya que, como tal, no ha podido ser aislado de humanos, aunque su presencia se infiere por las secuencias virales detectadas en los tumores, y, además, como dijimos más arriba, por la presencia de anticuerpos circulantes.

Hay en esta historia un tercer período que se extiende hasta el presente en que se ha tratado de descalificar los resultados obtenidos con el uso de la tecnología molecular. En este compromiso se encuentra la "División de cáncer, epidemiología y genética" (DCEG) del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (18), mientras que otras instituciones, como el NIH de EE.UU., están subsidiando numerosos proyectos para resolver el problema planteado hace cincuenta años atrás (19).

Por ahora, nos quedamos sin saber cuánto tiempo transcurrirá hasta que sea posible responder algunas preguntas :¿el virus SV40 causa cáncer o es un cofactor coadyuvante? ¿la

alta sensibilidad de las técnicas moleculares puede inducirnos a errores de tanta gravedad?

Entretanto, vale la reflexión sobre los problemas interminables que puede acarrear el uso de cultivos celulares sin los debidos controles en la producción de fármacos, si se volviera a cometer un error de esta naturaleza en este siglo XXI, sería un accionar absolutamente imperdonable, casi de naturaleza criminal.

Bibliografía

1. MMWR. april 8, 2005. 54(13), 335-336.
2. *Centers for Diseases Control (EE.UU.)
3. www.polioeradication.org
4. http://www.usatoday.com/news/health/2005-10-13-minn-polio_x.htm
5. Lewis AM Jr. Experience with SV40 and adenovirus-SV40 hybrids. Biohazards in biological research. New York (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1973. p96-113.
6. Sweet BH, Hilleman, MR. The vacuolating virus, SV40. Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 1960; 105: 420—7.
7. Butel JS, Lednicky JA. Cellular and Molecular Biology of Simian Virus 40: Implications for human infections and disease. Journal of the National Cancer Institute 1999. 91: 119- 134.
8. Viscidi RP, Rollison DEM, Viscidi E, Clayman B, Rubalcaba E, Richard D, Mayor EO and Shah KV. Serological Cross-reactivity between Antibodies to Simian Virus 40, BK virus, and JC Virus Assesed by Virus-like Particle-Based Enzyme Immunoassays. Clinical and Diagnostic Immunonology 2003, 10: 278-285.
9. <http://www.cdc.gov/nip/vacsafe/concerns/Cancer/default.htm>.
10. Pepper C, Jasani B, Navabi H, Wynford-Thomas D, Gibbs AR. Simian virus 40 large T antigen (SV40LTag) primer specific DNA amplification in human pleural mesothelioma tissue. Thorax 1996, 51:1074-1076.
11. Testa JR, Carbone M, Hirvonen A, Khalili K, Krynska B, Linnainmaa K, et al. A multi-institutional study confirms the presence and expression of simian virus 40 in human malignant mesothelioma. Cancer Res 1998, 58:4505-4509.
12. Griffiths DG, Nicholson AG, Weiss RA. Detection of SV40 sequences in human mesothelioma. Dev Biol Stand 1998, 94:127-136.
13. Galateau-Salle F, Bidet P, Iwatsubo Y, Gennetay E, Renier A, Letourneux M, et al. SV40-like DNA sequences in pleural meothelioma, bronchopulmonary carcinoma, and non-malignant pulmonary diseases. J Pathol 1998,184:252-257.
14. Vilchez RA, Madden CR, Kozinetz CA, Halvorson SJ, White, ZS, Jorgensen JL, et al. Association between simian virus 40 and non-Hodgkin lymphoma. Lancet 2002, 359:817-823.
15. Shivapurkar NS, Harada K, Reddy J, Scheuermann RH, Xu Y, McKenna RW, et al. Presence of simian virus 40 DNA sequences in human lymphomas. Lancet 2002,359:851-852.

16. Lednicky JA, Garcea RL, Bersagel DJ, Butel JS. Natural simian virus 40 strains are present in human choroid plexus and ependymoma tumors. *Virology* 1995,212:710-717.

17. The International SV40 Working Group. A multicenter evaluation of assays for detection of SV40 DNA and results in masked mesothelioma specimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001,10 (5):523-532.

18. <http://researchportfolio.cancer.gov/>.

19. <http://www-commons.cit.nih.gov/crisp>.

* Profesora titular consulta de Virología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

 **QuímicaViva**

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

Revista **QuímicaViva**
Número 3, año 4, diciembre 2005
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Marihuana, endocannabinoides y sus receptores

Dra. Ana Franchi*

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET). Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires.

afranchi@fmed.uba.ar

Recibido: 9/11/2005

Aceptado: 6/12/2005

Ese yuyo verde

“adonde el callejón se pierde
brotó ese yuyo verde...”

Homero Expósito



La marihuana es una mezcla verde o gris de flores secas cortadas en trocitos de la planta *Cannabis sativa*. Existen más de 200 palabras comunes para la marihuana incluyendo “faso”, “hierba”, “porro” y “Maria Juana”.

La marihuana (*Cannabis sativa*), famosa por contener alcaloides con efecto psicoactivo y también por producir una fibra muy resistente: el cáñamo usado en la manufactura de cuerdas y tejidos, es originaria de Asia central. Las primeras referencias de la marihuana datan de 2737 a.C. donde es mencionada en un tratado atribuido al emperador Shen-nung (China), del 2000 a.C. en la India al Atarva Veda y a tabletas cuneiformes de la época de Asurbanipal, 650 a.C. Herodoto describió el efecto euforizante de los baños de vapor de los escitas que la usaban para aliviar el dolor familiar en los ritos funerarios. Los relatos de Marco Polo y las Mil y una noches cuentan que era cultivada por el cáñamo y los efectos psicoactivos en Asia y Oriente.

En EE.UU, la marihuana se difundió hace no demasiado tiempo. Durante la segunda mitad del siglo XIX y principios del XX se vendía libremente como prescripción para un gran número de males incluyendo la migraña y las úlceras. Inmigrantes de Méjico la introdujeron en Nueva Orleans y otras grandes ciudades como droga recreativa, donde cobró popularidad. A partir del año 1930 comenzó a cuestionarse y hubo intensas campañas en su contra. En 1937 el Congreso de los Estados Unidos, en contra del consejo de la Asociación Médica Americana, aprobó la Ley Impositiva de la Marihuana, prohibiendo efectivamente el uso de la droga al hacerla cara y difícil de obtener.

Créalo o no, usted consume marihuana. Y no sólo eso: también la produce.

Luego de muchos años de investigaciones fue recién en 1964 que Rafael Mechoulam, de la Universidad Hebrea de Jerusalem, identificó al delta-9-tetrahidrocanabinol (THC), como el componente al que se atribuyen prácticamente todos los efectos medicinales de la marihuana.

Ahora bien cómo es posible que una molécula de origen vegetal tenga efectos sobre el sistema nervioso central del hombre. La respuesta la proporcionó un laboratorio en EEUU, el cual demostró que el delta-9-THC se acopla a una proteína localizada en la membrana de las células. Este es un receptor que se denominó posteriormente como CB (canabinoides) y la nomenclatura de los receptores se amplió cuando se caracterizaron receptores en el SNC, los cuales fueron llamados CB1; mientras que aquellos que presentaban una distribución periférica en el sistema inmune eran referidos como CB2.

Entonces los investigadores se preguntaron por qué una molécula producida por una planta tenía receptores en el cerebro. Nuevamente el Dr. Mechoulam vino en nuestra ayuda descubriendo un pequeño ácido graso que era producido por el cerebro y que imitaba todas las actividades de la marihuana. La llamó anandamida, del sánscrito *ananda*, "el que trae bendición y tranquilidad interna".

En el año 1997 Daniele Piomelli y Nephi Stella, de la Universidad de California, descubrieron otro lípido, el 2-araquidonoil glicerol, (2-AG), aún más abundante que la anandamida, en ciertas regiones del cerebro. Ambos compuestos se consideran los principales canabinoides endógenos, o endocannabinoides.

Todos conocíamos a la marihuana, pero no todos sabíamos que nuestro cuerpo era capaz de fabricar su "propia marihuana".

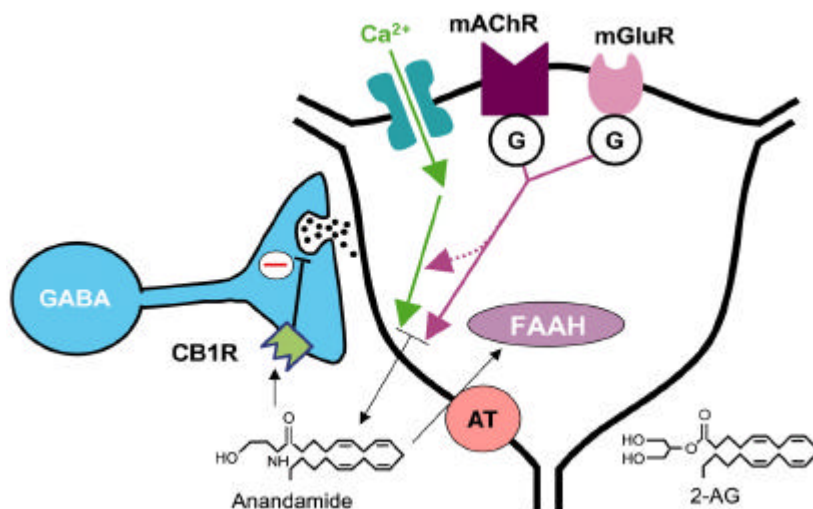
¿Neurotransmisores a pedido?

La mayoría de los neurotransmisores hasta ahora conocidos son solubles en agua y se almacenan en vesículas, a la espera de una señal para ser liberados por la neurona. Cuando una neurona "dispara", enviando una señal eléctrica por su axón hacia las terminales "presinápticas", los neurotransmisores liberados de sus vesículas cruzan la abertura sináptica y ejercen su efecto a través de sus receptores de la neurona "post-sináptica".

Sin embargo los endocannabinoides, son lípidos y no están almacenados en vesículas ni se encuentran pre-formados, sino que son rápidamente sintetizados a partir de sus precursores en la membrana celular, cuando los niveles de calcio dentro de la neurona se elevan o cuando se activan ciertas proteínas G.

Además, se había observado que los impulsos nerviosos se transmitían siempre en un sólo sentido, desde la célula presináptica hacia la postsináptica.

Alger y sus colegas de la Universidad de Maryland y Marty de la Universidad de Paris observaron que tanto en las neuronas del hipocampo como del cerebelo las células receptoras parecían capaces de enviar a su vez señales "de vuelta" a las células emisoras. Esta señalización retrógrada es característica de los endocannabinoides. Tanto la AEA como el 2-AG, son sintetizados en las células postsinápticas como las células piramidales del hipocampo. La síntesis se inicia por un influxo de calcio a través de canales dependientes de voltaje, o por la activación de una proteína G acoplada al receptor del neurotransmisor. Los endocannabinoides llegan al espacio extracelular y activan los receptores CB1 que se encuentran en ciertas terminales nerviosas. La activación de los receptores CB1 conduce a la inhibición presináptica del GABA o a la liberación de glutamato al inhibir los canales de calcio y activar los canales de potasio. Los endocannabinoides pueden entrar a las células presinápticas o postsinápticas por el transportador de anandamida (AT). Además en las células postsinápticas está presente la FAAH (hidrolasa de amidas de ácidos grasos), enzima que degrada la anandamida y en las presinápticas la monoglicérido lipasa, que degrada el 2-AG.



Alger, Bradley E. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 8512-8513

"Ananda" te busco y no te encuentro...

***"La cucaracha, La cucaracha
Ya no puede caminar, porque
le falta porque no tiene,
marihuana pa' fumar"***

(Popular corrido de la revolución mexicana)

Ahora sabemos que los receptores CB1 parecen estar presentes en todos los vertebrados y que **no afectan el desarrollo del miedo pero sí el olvido del miedo**; no alteran la habilidad de comer pero sí el deseo de comer. Y tanto la baja cantidad de receptores en las neuronas presinápticas como la falta de emisión de los endocannabinoides tienen relación con los síndromes de **stress postraumático, fobias y algunas formas de dolor crónico**. Esta sugestión encaja bien con el hecho que cierta gente fuma marihuana para disminuir su ansiedad.

¿Liberad a María?

“Un, dos, tres un pasito pa'delante,
María...”

Ricky Martin

La marihuana natural es consumida en medicina de múltiples maneras: inhalada o fumada (contra el asma, para mejorar la visión nocturna, la opresión, la sofocación, el insomnio, la ronquera, la extinción de la voz), en infusiones de té (para combatir las náuseas y otras molestias causada por los efectos secundarios de la quimioterapia en pacientes con cáncer), aplicada localmente (para combatir el dolor). Terapéuticamente se aconsejó para tratamientos de insomnio y como sedante para el dolor (en artritis, reuma, lesiones de médula, paraplejia y tetraplejia). También se prescribió para terapias de trastornos nerviosos, temblores en parálisis compulsivas, espasmos de vejiga e impotencia sexual que no provenga de enfermedad orgánica.

Los adelantos en los estudios de los efectos del THC y los endocannabinoides ha permitido avanzar en el diseño de nuevos tratamientos para la ansiedad, el dolor, las náuseas, la obesidad y el daño cerebral.

Actualmente se pueden conseguir comercialmente varios THC sintéticos, como el nabilone o el dronabinol que sirven para combatir las náuseas producidas por la quimioterapia y que estimulan el apetito en pacientes con Sida.

Por su parte el savitex, un extracto de la planta con porcentajes iguales de THC y CBD, está por ser autorizado por las autoridades médicas canadienses, para aliviar los dolores neuropáticos, los espasmos de la esclerosis múltiple y la artritis.

Por otro lado se ha desarrollado un antagonista de los receptores CB1, el Rimonabant, obteniéndose resultados positivos en estudios relacionados con la reducción de peso, abandono del tabaco e incluso el control de peso en los que dejan de fumar.

Haz recorrido un largo camino...

Hace más de 4000 años que la humanidad utiliza esta planta con fines recreativos y terapéuticos. Desde hace mucho menos tiempo hemos avanzado en las causas y los mecanismos involucrados en su acción. Actualmente se abre un vasto campo para la utilización tanto de agonistas como antagonistas de los cannabinoides en diversas patologías.

Bibliografía

1. Mechoulam R, Gaoni Y. A total synthesis of dl-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of Hashish. J Am Chem Soc. 1965. 87:3273-3275.
2. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. Nature. 1997. 388:773-778.
3. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science. 1992. 258:1946-1949.
4. Alger BE. Endocannabinoids: getting the message across. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. 101:8512-8513.
5. Zias J, Stark H, Sellgman J, Levy R, Werker E, Breuer A, Mechoulam R. Early medical use of cannabis. Nature. 1993. 363:215.
6. Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol. 1988. 34:605-613.

* Investigadora Principal del CONICET.

Directora del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET). Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.



Revista **QuímicaViva**
Número 3, año 4, diciembre 2005
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Aplicaciones de la técnica de *microarrays* en ciencias biomédicas: presente y futuro

Dra. Paola Roxana Barrero

Investigadora Asistente CONICET
Laboratorio de Virología, Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez"
Gallo 1330 piso 2 C1425EDF Buenos Aires Argentina
paobarrero@fibertel.com.ar

Recibido: 28/10/2005

Aceptado: 2/12/2005

En esta era donde la globalización ocupa las primeras páginas de los medios de comunicación masivos, donde la tecnología y las comunicaciones son pilares de la economía mundial, la ciencia tiene sus propios desafíos. Tanto la globalización como la tecnificación han producido un cambio esencial en el método científico, la relación "un experimento, un dato" deja de ser obvia, y el resultado final de los nuevos experimentos es un caudal de datos que deben procesarse minuciosamente para extraer *la información* útil al científico. Desde que se completó el proyecto genoma humano, las preguntas se han sucedido en cuanto a identificar las funciones, regulación e interacción de genes en procesos celulares y cambios en la expresión génica debidos a enfermedad o tratamiento. Una década atrás pensar en un experimento que abarcara la detección de cada transcripto en una célula hubiera parecido extraído de una película de ciencia ficción. Hoy es posible gracias a que múltiples disciplinas aunaron esfuerzos para integrarse en el desarrollo, diseño y análisis de *microarrays*. Pero ¿qué es un *microarray*? ¿Qué preguntas pueden contestar estos experimentos?

Espero que luego de leer este artículo tenga el lector una idea más clara y una perspectiva de los alcances de esta nueva tecnología.

Introducción

Los genes consisten en porciones de ácido desoxirribonucleico (DNA) que codifican por una proteína en particular. Cada segmento de DNA genómico, organizado en cromosomas en el núcleo celular, está construido con cuatro bloques de nucleótidos constituido por un grupo fosfato, un azúcar desoxirribosa y una de las cuatro bases nitrogenadas: Adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Durante la síntesis de RNA (transcripción) la doble cadena de DNA se despliega y una de ellas es usada como molde para generar una copia complementaria de cadena simple con la base uracilo que reemplaza a la timina. El RNA es procesado luego de manera que a partir de un transcripto primario se generan diferentes clases, entre ellas el mRNA que en eucariotas lleva un cap 5', una cola de poli-A y no contiene intrones. En el proceso siguiente de traducción, se sintetizan proteínas a partir del mRNA en los ribosomas. La correspondencia entre las cuatro letras presentes en el DNA y los 20 aminoácidos que forman las proteínas está dada por el código genético, que vincula tres bases (codón) a un aminoácido. La proteína sufre diferentes modificaciones post-traducción hasta ser completamente funcional. De esta manera, las características estructurales y funcionales de células y tejidos están determinadas por la expresión simultánea, selectiva y diferencial de miles de genes (Figura 1).

Una propiedad importante del DNA es la complementariedad de las bases que lo componen, así la timina se complementa con la adenina y la guanina con la citosina por medio de puentes hidrógeno de las cadenas opuestas del DNA. Esta propiedad es la base molecular de la técnica de *microarrays*, donde hebras de DNA de diferente origen van a hibridizarse por complementariedad de las bases que las componen.

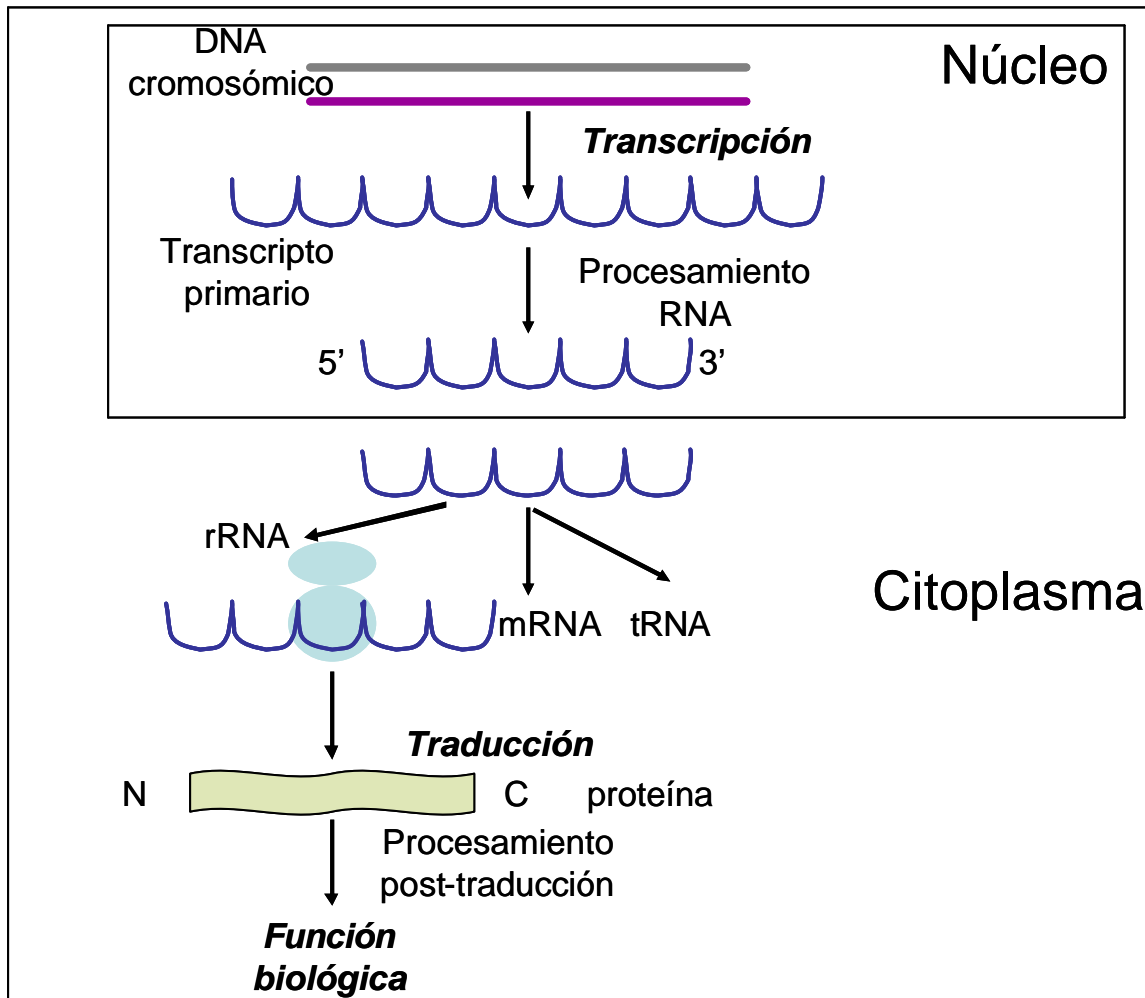


Figura 1: Dogma central de la biología molecular: el material genético consiste de DNA, que se transcribe a mRNA que sirve como molde para la síntesis de proteínas. mRNA: RNA mensajero; rRNA: RNA ribosomal; tRNA: RNA de transferencia.

El fundamento de la tecnología empleada en *microarrays*

La metodología clásica utilizada para la detección y cuantificación de mRNA presente en una célula es el análisis por *Northern blot* donde una sonda radioactiva en solución se une con un mRNA inmovilizado en un soporte. Otro método usado es la RT-PCR, donde el mRNA es copiado a cDNA (DNA complementario) y se genera un intermediario de doble cadena por la reacción de transcripción reversa (RT) y posterior amplificación de la cadena por la reacción de la polimerasa (PCR). En estos ensayos el principio fundamental es la hibridación, que se basa en la complementariedad de las bases, pero su debilidad es la detección. En el primer caso la detección de emisión de radioactividad requiere pasos adicionales como la autorradiografía y en el mejor de los casos el escaneo con detectores de radiaciones β y γ que aumentan hasta 100 veces la sensibilidad de la técnica. En el caso de la RT-PCR los niveles de detección han aumentado significativamente mostrando en tiempo real la duplicación exacta del material inicial en la reacción de PCR por la incorporación de fluoróforos

a la doble cadena naciente. Esto permite detectar cambios de dos órdenes de magnitud comparado con los geles de bromuro de etidio que manifiestan cambios de diez órdenes de magnitud.

Estas técnicas suplieron las necesidades durante muchos años pero sufren la limitación del número de genes a reportar. Actualmente se requieren de reportes globales o de miles de genes a la vez, imposibles de detectar por radioactividad, debido a que estos ensayos soportan una cierta densidad de puntos en simultáneo, o por PCR en tiempo real, dadas las limitaciones de realizar los ensayos de 96 muestras cada vez (una placa).

La palabra *microarray* deriva del griego *mikro* (pequeño) y del inglés *array* (distribución ordenada). Podríamos decir que las micromatrices o microarreglos permiten el depósito de miles de puntos conteniendo genes o parte de genes sobre un portaobjetos para su estudio en paralelo. De esta manera es posible tener una visión instantánea de actividad de genomas completos o de un grupo selecto de genes.

En los estudios de *microarrays* se combinan las técnicas de hibridización de ácidos nucleicos y detección por fluorescencia. De esta manera, sólo en los puntos del portaobjeto donde haya ocurrido hibridización habrá fluorescencia y la intensidad de la fluorescencia detectada será proporcional al nivel de expresión del gen en estudio.

Una condición indispensable es que cada uno de los genes que esté representado sea fácilmente distinguible de otros. En otras palabras la porción del gen inmovilizada en el portaobjeto debe llevar consigo, independientemente de su tamaño, su cédula de identidad. Este punto es de especial importancia en el diseño de los *microarrays* y se basa en búsquedas exhaustivas en las bases de datos públicas (como *Unigene* y *GenBank*) y selección por ensayos de prueba y error.

Componentes de un experimento de *microarrays*

Dada una pregunta biológica o un planteo de sondeo global se obtiene una muestra que será marcada para su posterior detección. Esta muestra marcada es enfrentada al *microarray* donde ocurre la hibridización. Un seguimiento exhaustivo por análisis de imágenes detectará los puntos marcados y los remitirá al correspondiente gen. Luego, por uso de algoritmos de interpretación se extraerán los datos más relevantes según la hipótesis o se describirán los aspectos que marcan diferencias significativas en experimentos de exploración (Figura 2). Este esquema básico refleja, en cada uno de sus componentes, decisiones importantes que el investigador debe tomar y que no limitan el método a una hazaña biotecnológica sino al resultado de un arduo entrenamiento técnico y del trabajo en equipo. Comentaremos sus componentes a continuación.

Muestras biológicas

El primer componente que introduce variación al experimento es la muestra en sí. El éxito de un ensayo de *microarrays* depende en gran parte de la calidad de la muestra obtenida. El RNA total debe estar intacto y puro, no debe contener proteínas ni DNA contaminante. Para ello se exige que sea evaluada su cantidad y calidad por espectrofotometría y su integridad por electroforesis (deben observarse las bandas de rRNA 28S y 18S en proporción y peso molecular adecuado).

Sin hacer mención de los aspectos éticos subyacentes, definir patrones universales con experimentos costosos como los de *microarrays* es una cuestión que no tiene solución aún. La heterogeneidad que presentan líneas celulares inmortalizadas es mínima ante la que pueda presentar una biopsia tomada de un tejido tumoral. Es imposible tener dos muestras biológicas del mismo individuo que den resultados similares por el solo hecho de haberlas manipulado en eventos independientes. A su vez, las comparaciones suelen hacerse contra tejidos normales, pero no existen consensos para las definiciones de normal y afectado, dado que factores como los antecedentes genéticos, sexo, edad, etapa de desarrollo, diferenciación y crecimiento dirigen los patrones de expresión. Tampoco debemos olvidarnos que los tejidos son de diversa composición celular y que cada una de estas células activará diferentes programas de expresión ante diferentes estímulos.

Se ha planteado el uso de mRNA "universales" o de especies diferentes que funcionen como controles internos del ensayo. Estos controles se procesan en conjunto con la muestra y contienen en el *microarray* sondas específicas que monitorean la calidad del ensayo. De esta manera, se comprobó por diluciones seriadas que los más modernos *microarrays* pueden detectar hasta un transcripto (1 molécula aislada de mRNA). Este es un paso importante que da confiabilidad a la técnica, probando que hasta en el nivel más bajo de transcripción, los transcriptos más raros y menos abundantes serán tomados en cuenta para el análisis.

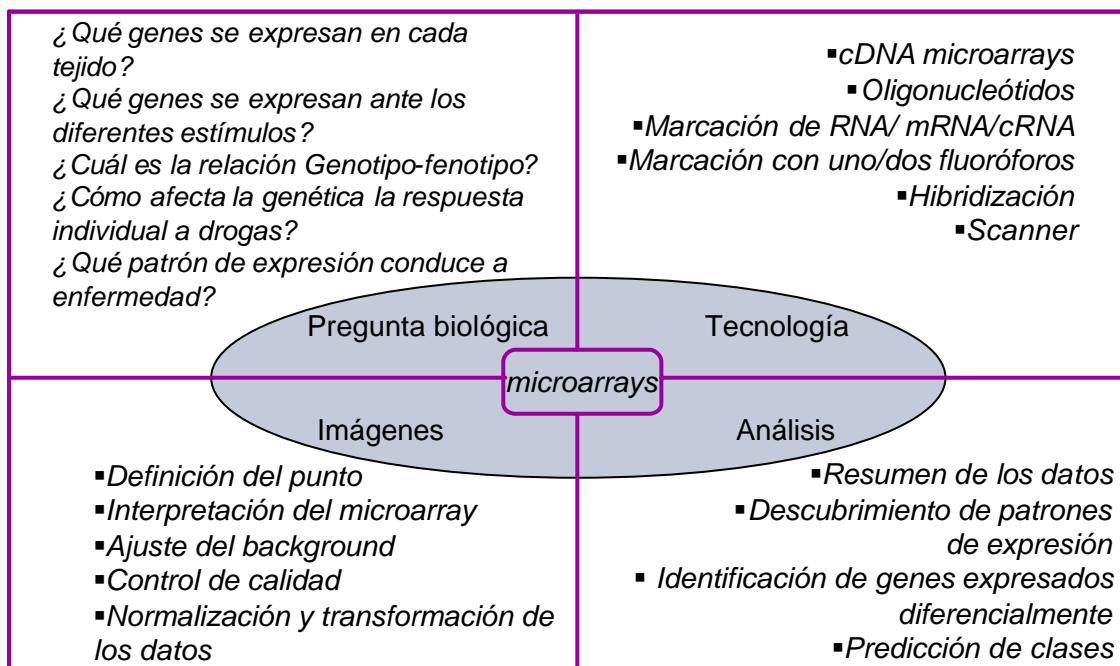


Tabla 2 :Puntos importantes en cada paso de un experimento de *microarrays*

Diseño experimental

El diseño experimental es esencial en los experimentos de *microarrays* y es crucial desde la recolección de muestras y criterios de inclusión, la elección del *microarray* a ensayar y el método para inferir los resultados. En general las preguntas biológicas conducen a probar hipótesis o a producir datos nuevos mediante asociación con parámetros estadísticos. En el primer caso los resultados

obtenidos corroboran la hipótesis planteada y en el segundo los datos hablan por sí mismos. Ambas estrategias son válidas si las herramientas usadas para convertir los datos en información y la información en conocimiento son robustas.

En muestras patológicas se ha propuesto trabajar con mezclas provenientes de diferentes pacientes afectados para reducir el efecto "personal" en el patrón de expresión. También es indispensable realizar duplicaciones biológicas y técnicas del experimento. Un duplicado biológico es aquel donde se obtiene RNA en dos eventos diferentes o RNA de individuos diferentes que se integran en el análisis. Los duplicados técnicos son las hibridaciones de un mismo RNA en diferentes *microarrays* para evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. De todas maneras, estas repeticiones, aunque mejoran la certeza de los datos obtenidos, no solucionan el problema del tamaño de la muestra en *microarrays*.

Tipos de *microarrays*

El concepto básico en *microarrays* es el posicionamiento preciso en un soporte sólido de elementos que funcionen como detectores moleculares en altas densidades. En la práctica, los *microarrays* abarcan una amplia gama que puede tener diferentes soportes (membranas o vidrio) y diferentes moléculas que interaccionan en este medio.

Para poder clasificar los *microarrays* debemos dejar claro qué se entiende por *target* (blanco) y que se define como *probe* (sonda). Existen controversias al respecto pero tomaremos por blanco a la molécula libre y como sonda a la inmovilizada.

Existen diversos tipos de *microarrays* según las sondas utilizadas que abarcan metodologías muy variadas que van desde lo más casero hasta lo más sofisticado. Los tipos más comunes son:

Microarrays de ácidos nucleicos

Microarrays de cDNA

Las sondas son producidas en laboratorios mediante la amplificación selectiva de cDNAs (100-3000 nucleótidos) por PCR en placas de 96 pocillos. Estos amplicones se purifican, se verifica su calidad y cantidad y se depositan por capilaridad en portaobjetos de vidrio mediante costosos robots que requieren un ambiente libre de partículas.

Microarrays de oligonucleótidos

Las sondas son porciones de DNA sintético de cadena simple que pueden ser cortas (15-25 nucleótidos) o largas (50-120 nucleótidos). Estos fragmentos pueden ser presintetizados y depositados en portaobjetos por robots o sintetizados *in situ* y depositados por *ink jet* o fotolitografía (DNAchips).

Los *microarrays* que contienen fragmentos presintetizados (cDNA u oligos) pueden ser fabricados en laboratorios con infraestructura adecuada, pero los sintetizados *in situ* o los que vienen con genes preseleccionados prearreglados (*bioarrays*) deben ser adquiridos a diferentes proveedores que poseen plantas con un nivel más alto de complejidad y delicados controles de calidad. Los *arrays* de cDNA son los más flexibles y usados en investigación porque permiten depositar genes o fragmentos de genes amplificados de cualquier especie y así diseñar y generar de manera sencilla y

menos costosa el grupo de sondas. Por otro lado, requiere de réplicas tanto en el mismo soporte como duplicados técnicos, dado que su punto débil es el depósito del amplicón y la reproducibilidad de sus características físicas (dimensiones, área, límites). La tendencia actual es usar oligonucleótidos de longitud corta, aunque todavía existen quienes cuestionan la especificidad dada por el diseño de sondas tan pequeñas, evidentemente, años de experiencia en diseño de PCRs avalan las ventajas de esta opción.

Microarrays de proteínas

Las sondas son anticuerpos fijados a portaobjetos de vidrio y los blancos son muestras de suero o tejido. Esta técnica se ve por el momento restringida por varios puntos que requieren de tiempo para esclarecerse. Entre ellos podemos mencionar la dificultad de fabricar e inmovilizar estructuras 3D como son las proteínas y detectar interacciones de proteínas plegadas, sin olvidar mencionar que no se dispone aún de colorantes fluorescentes que permitan cuantificar eficientemente a estas moléculas.

Microarrays de tejidos (TMA)

Esta técnica trata de resolver uno de los problemas principales y limitantes en análisis moleculares de tejidos: el tamaño limitado de la muestra. Se utiliza una aguja hueca par tomar muestras milimétricas de las regiones de interés de tejidos embebidos en parafina, en especial biopsias. Luego se depositan de manera ordenada en un nuevo bloque de parafina y se cortan con un micrótopo entre 100-500 veces y se reordenan sobre portaobjetos de vidrio donde se realizarán pruebas múltiples a nivel DNA, RNA y proteínas (inmunohistoquímica, hibridización *in situ*).

Comparative Genomic Hybridization (CGH)

Es un método citogenético molecular que permite monitorear anomalías cromosómicas. Las alteraciones se clasifican en pérdidas, ganancias y amplificaciones de DNA, incluyendo mutaciones a nivel de cromosomas completos y por *loci*. Permite monitorear tumores y defectos congénitos a partir de cromosomas en metafase o DNA genómico. La técnica se basa en la hibridización competitiva donde se colorea el DNA tumoral con un marcador fluorescente y el DNA blanco con otro. Permite el estudio de material de archivo como muestras congeladas o embebidas en parafina con el fin de correlacionar la evolución clínica con aberraciones cromosómicas.

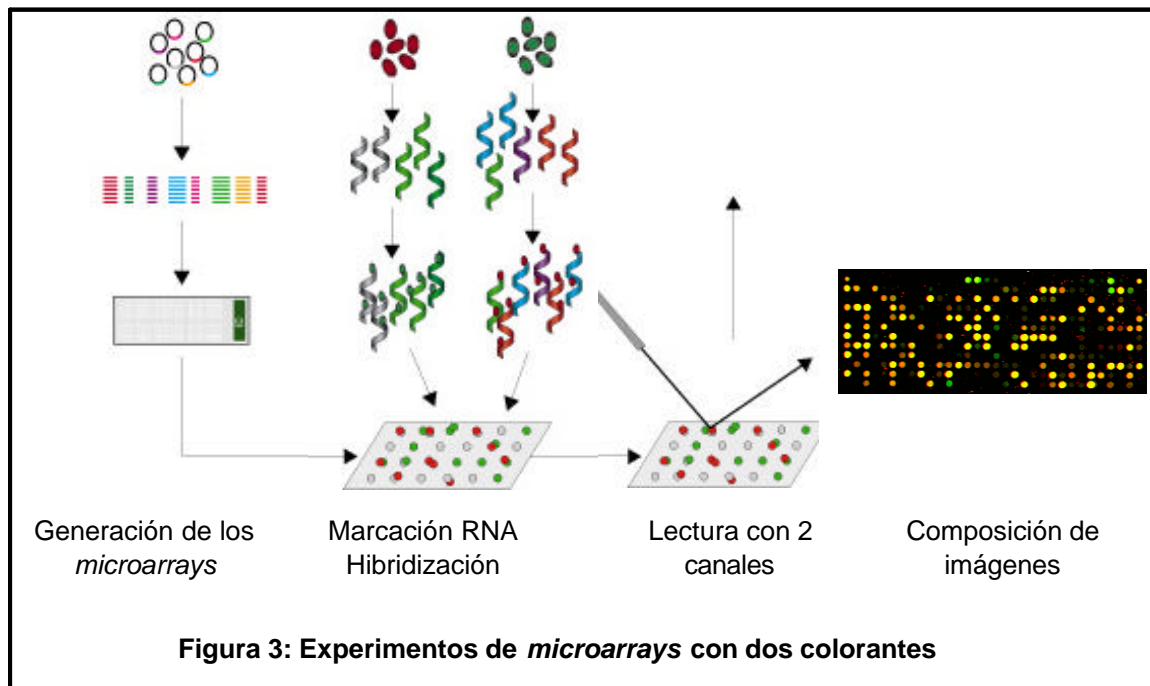
La descripción técnica de los aspectos analíticos de estos últimos tres puntos excede el objetivo de esta revisión y en adelante nos centraremos en los arreglos más usados que son los microarreglos de DNA.

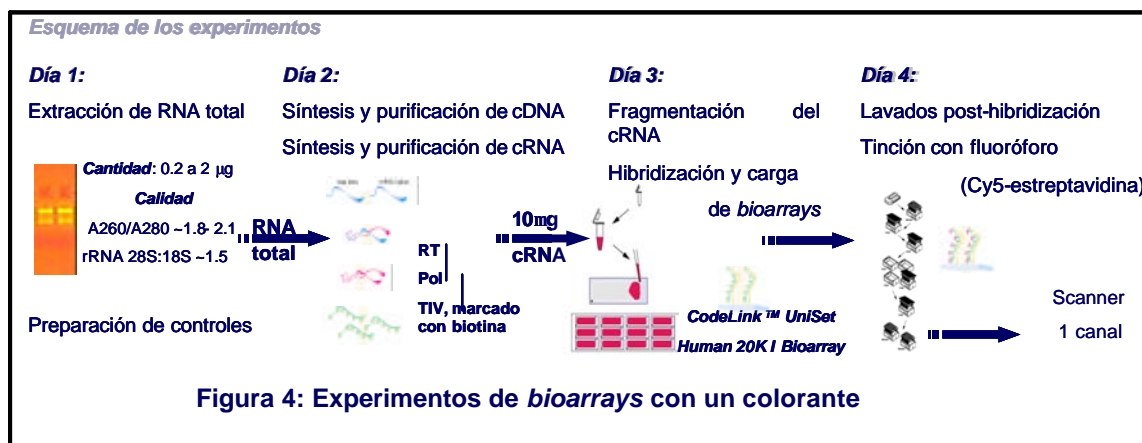
Consideraciones técnicas

Marcación e hibridización del blanco

En los experimentos de expresión génica el RNA total es obtenido de la muestra biológica y marcado con un colorante fluorescente para su posterior detección. Las primeras propuestas fueron marcar con dos colorantes derivados de cianinas (Cy5 rojo y Cy3 verde) las muestras de RNA total durante el proceso de transcripción reversa o modificar químicamente los nucleótidos *a posteriori*. Estas muestras provenientes de dos condiciones a comparar se mezclan en cantidades iguales y se

hibridizan competitivamente en el mismo *microarray*. La lectura se hace con detectores que permitan detectar los espectros de emisión de los dos colorantes en canales diferentes y generar imágenes separadas para cada uno de ellos. Los inconvenientes que plantea este procedimiento son las masas abundantes necesarias de RNA (20-75 μg) y la afinidad diferente de los distintos colorantes por el blanco. Esto hace imperativo que en el diseño se incluyan experimentos donde las muestras sean marcadas adicionalmente con el colorante opuesto para obtener resultados más confiables. Una complejidad adicional se plantea en el análisis de las imágenes, ya que para medir expresión diferencial deben componerse en un solo archivo de imágenes la superposición resultante del archivo generado con el colorante verde y el archivo generado con el colorante rojo (Figura 3). De esta manera los puntos que resulten verdes estarán expresados diferencialmente en una condición y los rojos en otra, mientras que los amarillos estarán expresados en ambas (Figura 3). Estos inconvenientes son superados cuando se trabaja con protocolos más modernos con RNA copia (cRNA) que resulta de la transcripción *in vitro* del RNA original. Las cantidades requeridas para realizar el experimento son ínfimas (0.2-2 μg) y se marca con un solo colorante. La desventaja de este método es que se hibridiza una muestra por *microarray*. En cuanto a la hibridización, las técnicas y protocolos han mejorado radicalmente con procedimientos que tienden a reemplazar los hornos de hibridización y posteriores lavados manuales por condiciones más estandarizadas y cámaras de hibridización flexibles incluidas sobre el portaobjeto de vidrio (Figura 4)





Análisis de los datos

Una vez obtenido el/los archivos de imágenes, hay que transformar las intensidades de las señales obtenidas en datos numéricos, discriminando la señal informativa del ruido que pudiera haber en segundo plano. En este proceso hay que considerar las dimensiones y forma de cada punto analizado de la imagen, su localización y los parámetros estadísticos que pueden asociarse a ellos. Los controles de calidad son realizados para cada imagen.

Es en este punto donde el trabajo multidisciplinario se vuelve indispensable. El manejo de una cantidad extensa de datos en simultáneo requiere el uso de algoritmos de computación para obtener, manejar, procesar y almacenar la información en paralelo. En este escenario los bioinformáticos aportan su conocimiento a los experimentos de *microarrays*.

De esta manera se obtiene una matriz de expresión donde las filas serán genes y las columnas experimentos. En los diseños con dos colorantes se trabaja con proporciones entre las intensidades medidas con cada uno de ellos y en los realizados con un solo colorante estos datos son absolutos. En ambos casos los datos se normalizan y transforman para disminuir las variaciones y hacer los cálculos posteriores más sencillos.

En este punto agregamos al grupo de trabajo un experto en bioestadística que pueda aplicar los supuestos correspondientes para realizar comparaciones que sean válidas estadísticamente. Para un gen dado (fila) pueden compararse las intensidades entre muestras y generar un reporte que exprese encendido y apagado de genes o de cuántas veces más o menos expresado se encuentra en las diferentes condiciones ensayadas. No deben compararse intensidades entre genes (filas) del mismo experimento ya que el nivel de expresión es una propiedad de cada gen, se puede modificar por la expresión de otro gen presente en altos niveles en el mismo experimento y está ligado a complejas vías de control.

Métodos de Agrupamiento y Visualización de los datos

El análisis de agrupamiento o *Clustering* de la matriz de expresión consiste en reunir genes basándose en la similitud de su perfil de expresión

Existen métodos no supervisados y supervisados basándose en datos previos para concentrar los patrones de expresión relacionados. Entre los métodos no supervisados el más empleado es "k-media" y es apto para organizar datos exploratorios exhaustivos. "K-media" es un algoritmo de partición que divide los ítems en k-grupos de manera que la suma de las distancias al

centro del grupo sea mínima. Por otro lado los métodos supervisados requieren un grupo de experimentos que los entrene (*training set*) para generar reglas que puedan hacer predicciones o clasificar datos a testear (*testing set*). Entre ellos podemos mencionar a los basados en redes neuronales de aprendizaje. Los esquemas resultantes son de fácil visualización y altamente informativos.

Interpretación de los datos: *data mining*

Existen diferentes algoritmos que permiten extraer de un grupo selecto de genes su ontología (GO). La ontología de los genes proporciona un vocabulario controlado para describir características de genes y productos génicos en términos de los procesos biológicos asociados, los componentes celulares y la función molecular de manera independiente de la especie en cuestión. Los principios de organización del GO son que un gen tiene una o más funciones moleculares, usadas en uno o más procesos biológicos y puede asociarse a uno o más componentes de la célula.

A partir del conocimiento de los términos de GO y de atribución de éstos a los datos de *microarrays* se pueden visualizar las vías metabólicas que están siendo modificadas.

Reporte de los datos: se creó un consorcio que colecta los datos mínimos acerca de un experimento de *microarrays* (MIAME) de manera que el formato para importar y exportar datos entre laboratorios sea compatible. Este campo es crítico y las publicaciones requieren que se cumplan estos puntos.

Las herramientas contenidas el GEO (*Gene Expression Omnibus*) permiten visualizar, buscar y obtener datos sobre expresión génica.

Reflexión final

Cada célula contiene una dotación completa de cromosomas. Sin embargo, la expresión diferencial de los genes es la que dará a esa célula su función biológica. Este proceso de expresión génica es muy complejo en cuanto a regulación y permite a la célula responder de manera dinámica ante cambios instantáneos. Los experimentos de *microarrays* permiten monitorear en cada momento la expresión génica durante una enfermedad, los cambios en tejidos tumorales, la expresión de marcadores relacionados con factores pronósticos de enfermedad o toxicidad, y los polimorfismos de genes, entre otras tantas aplicaciones.

La magnitud creciente de información y el desarrollo de técnicas innovadoras provee hoy al investigador de herramientas poderosas, flexibles, no tóxicas y de alto rendimiento. Esta escala ampliada, tanto en la cantidad como en la calidad de los datos obtenidos en experimentos de *microarrays* plantea una cuestión adicional no sólo porque el volumen de datos que deben ser procesados es muy elevado, sino también porque muchos de dichos datos son obtenidos de manera colateral, sin una hipótesis previa que guíe el experimento, o involucran genes que hoy no tienen función asignada aún para organismos modelo. La información global no es ni buena ni mala en sí misma, es un instrumento que, adecuadamente utilizado, permitirá alcanzar mayores niveles de conocimiento.

La evolución de esta tecnología de avanzada en el tiempo llevó a una disminución de los costos asociados y de los requerimientos de infraestructura, haciendo hoy factible su aplicación en empresas farmacéuticas y en un futuro no muy lejano en centros biomédicos especializados. La implementación de estudios de expresión génica en la población marcará el camino hacia una medicina personalizada donde las estrategias de diagnóstico y monitoreo del tratamiento se basarán en la evidencia aportada por experimentos de *microarrays*.

Responsabilidad: los datos y opiniones presentados en esta revisión reflejan mi punto de vista que ha sido elaborado durante cinco años de lectura de bibliografía pertinente, discusión con expertos y entrenamiento en los diferentes aspectos de los ensayos de *microarrays*.

Referencias y Sitios de interés en Internet

Nature Genetics (1999), Volume 21 No 1s: The chipping forecast I

Nature Genetics (2002), Volume 32 No 4s: The chipping forecast II.

Nature Medicine (2003) Volume 9 No 1: 140-145

Nature Genetics (2005) Volume 37 No 6s: The chipping forecast III

The Gene Expression Omnibus (GEO): A Gene Expression and Hybridization Repository.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Microarrays: chipping away at the mysteries of science and medicine.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html#microarrays>

The 7 keys to successful microarray data analysis. <http://www.microarraysuccess.com/web/info.html>

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 4, diciembre 2005

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Autoanticuerpos contra receptores muscarínicos en cáncer de mama

Gabriel Fiszman¹, Valentina Cattaneo¹, Eulalia de la Torre², Lucas Colombo¹, Cristina Middonno¹, Eugenia Sacerdote de Lustig¹, María Elena Sales^{2*}

¹Instituto de Oncología A.H. Roffo. Facultad de Medicina UBA. ²Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO-CONICET). Facultad de Medicina, UBA.

e-mail: mesales@2vias.com.ar

Recibido: 11/11/05
Aceptado: 6/12/05

Resumen

Se ha investigado exhaustivamente, la capacidad de células transformadas para inducir una respuesta inmune eficaz en portadores de tumor. En particular, la detección y el papel de anticuerpos (Acs) específicos contra antígenos (Ags) tumorales en los pacientes con cáncer ha dado resultados contrapuestos. Previamente caracterizamos la expresión de receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) en células LM3, derivadas de un adenocarcinoma mamario murino espontáneo de la cepa BALB/c. Estas células presentan una mayor expresión de RCM en comparación con células normales de epitelio mamario murino, NMuMG. En este trabajo, investigamos la capacidad de las proteínas RCM sobre-expresadas para inducir una respuesta humoral autóloga en portadores del tumor LM3 y la función de los Acs formados en la progresión tumoral. Detectamos autoAcs contra RCM en la fracción IgG purificada del suero de portadores de tumor pequeño (Tp) y tumor grande (TG) formados 14 días y 28 días después de la inoculación subcutánea de células tumorales, respectivamente. La IgG proveniente del suero de portadores de Tp estimula significativamente la proliferación de células tumorales, mientras que la de portadores de TG la inhibe. Ambos efectos fueron reducidos por el pretratamiento de las células LM3 con el

antagonista muscarínico atropina (AT). La IgG purificada de animales normales estimuló la proliferación de células LM3 pero el efecto no fue modificado por AT. La IgG de portadores de tumor desplazó la unión del radioligando muscarínico tritiado, bencilato de quinuclidinilo ($[^3\text{H}]\text{-QNB}$) a los RCM en células LM3 en forma dependiente de la concentración, lo que evidenció la interacción de los Acs con los receptores expresados en dichas células. Asimismo, la IgG de portadores de tumor reconoció, en ensayos de inmunomarcación de homogenatos de corazón murino, una proteína cuyo peso molecular coincide con la que reconoce un Ac monoclonal específico contra el receptor muscarínico de acetilcolina M_2 . Resultados análogos se obtuvieron en homogenatos de tumor y lisados de células LM3. Además observamos que la IgG purificada de portadores de TG estimula la respuesta neovascular inducida por células LM3 con participación de los RCM. Concluimos que los autoAcs presentes en el suero de portadores de tumor ejercen efectos protumorales diferentes por vía muscarínica mientras que en portadores de Tp estimulan la proliferación de células LM3 en portadores de TG, promueven la neovascularización.

Abstract

The presence and the role of antibodies (Abs) directed against tumor antigens in cancer patients has given off contradictory evidences. We had previously detected and characterized muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) in mammary tumor LM3 cells from BALB/c mice. These cells over-expressed mAChR from the M_2 subtype, in comparison with normal mammary cells. Here we investigate the ability of up regulated mAChR to induce a humoral autoimmune response in LM3 tumor bearers and autoAbs function in tumor progression. IgG fraction purified from small (sT) (14 days LM3 tumor) stimulated tumor cells proliferation while IgG from big tumor (bT) bearers (28 days LM3 tumor) inhibited tumor cells growth. Both effects were reduced by atropine (AT). We also observed that IgG from tumor bearers displaced the binding of the tritiated muscarinic antagonist $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ to LM3 cells in a concentration dependent manner, and recognized by immunoblotting a 70 kDa protein in tumor cells and murine heart membrane enriched fraction, that is also recognized by a monoclonal antibody against M_2 receptor, revealing IgG interaction with mAChR. In addition IgG from bT bearing mice potentated neovascular response induced in vivo by LM3 cells, effect that

was reduced by AT. In conclusion autoAbs against mAChR from LM3 tumor bearing mice exert different pro-tumor actions depending on the stage of tumor development: in sT bearing mice they stimulate tumor cells proliferation while in bT animals they potentate tumor neovascularization.

Introducción

Los conceptos sobre el papel del sistema inmune en la protección contra el cáncer se han enmarcado en dos posiciones extremas. Según la teoría de la inmunovigilancia, las células inmunocompetentes son las encargadas de detectar y eliminar células tumorales y desempeñan la función más importante para controlar el crecimiento tumoral. En oposición, la hipótesis de la estimulación inmune predice que bajos niveles de activación del sistema inmune producen una respuesta que potencia el crecimiento tumoral (1). En tumores humanos, se ha demostrado la presencia de un infiltrado de células inflamatorias, con predominio de linfocitos y macrófagos, aunque también pueden encontrarse células dendríticas, granulocitos y mastocitos. Se ha comprobado que estas células se encuentran activadas pues expresan receptores de interleuquina-2 o productos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. Sin embargo no se le ha podido asignar a la presencia de células inmunocompetentes un valor pronóstico en relación con la progresión del tumor (2). Durante la década del '80, los inmunólogos sugirieron que los linfocitos B de pacientes con neoplasias eran incapaces de desarrollar una respuesta inmune contra el tumor. Más aún, afirmaban que los Acs producidos por estas células no desempeñaban ningún papel en la progresión tumoral (3). Sin embargo recientemente se han detectado anticuerpos (Acs) en el suero de pacientes oncológicos que reconocen proteínas propias sobreexpresadas como las del golpe de calor, neuronales y nucleares (4-6). En mujeres con cáncer de mama se identificaron autoAcs con diferentes especificidades y se sabe que las células B que infiltran los carcinomas medulares de mama producen Acs contra autoantígenos (autoAgs) de membrana expuestos durante la apoptosis de células tumorales (7). Previamente hemos informado que las células LM3, derivadas del adenocarcinoma mamario murino M3, expresan constitutivamente altas concentraciones de receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) en comparación con células de epitelio mamario murino normal, NMuMG (8). Por ensayos de

inmunomarcación con Acs específicos contra todos los subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos (M_1 - M_5) demostramos una expresión mayoritaria del subtipo M_2 en las células LM3. En este trabajo nos proponemos investigar la presencia de Acs contra dichos RCM en el suero de portadores de tumor pequeño (Tp) y tumor grande (TG) (14 y 28 días de portación del tumor LM3, respectivamente). Asimismo estudiamos la capacidad de estos Acs para modular la proliferación celular y la angiogénesis tumoral.

Materiales y Métodos

Cultivos de líneas celulares

Se utilizaron células de la línea LM3, derivada del adenocarcinoma mamario murino M3, de aparición espontánea en hembras BALB/c en el bioterio del Instituto A.H. Roffo (9). Se obtuvieron suspensiones de las células, que crecen en monocapa, por tratamiento con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,02% en PBS libre de calcio y magnesio. Cada 2 días se reemplazó el medio de cultivo MEM con 5% de suero fetal bovino (SFB). La viabilidad celular se evaluó por el test de exclusión de azul Trypan y sólo se utilizaron suspensiones con una viabilidad mayor que el 90 %.

Obtención de sueros e IgG de portadores de tumor LM3

Hembras BALB/c se inocularon en un flanco con 4×10^5 células LM3 y se obtuvieron portadores de tumor pequeño (Tp) (masa tumoral: $0,260 \pm 0,068$ g de 14 días de portación) y tumor grande (TG) (masa tumoral: $1,354 \pm 0,330$ g de 28 días de portación). Los sueros de animales normales y portadores de Tp y TG se obtuvieron por sangrado retro-orbital y se incubaron a 37°C durante 1 hora para retraer el coágulo. Luego se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el complemento por calentamiento a 56°C durante 30 minutos y se conservaron a -20°C hasta su uso. La fracción IgG de los sueros se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A-Sepharosa con un método de alta concentración salina. Las fracciones se eluyeron en buffer citrato pH 3, controlando la absorbancia del eluido a 280 nm. Las muestras se concentraron por evaporación, mediante centrifugación bajo vacío y se dializaron contra PBS a 4°C durante toda la noche. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (10).

Proliferación celular

Las células LM3 se sembraron en placas de 96 pocillos (10^4 cél./pocillo) en MEM con 5% de SFB, se incubaron por 24 horas a 37°C y se privaron de suero 24 horas antes del ensayo. Luego de tratar con atropina (AT) 10^{-5} M por 15 minutos, se incubaron con los sueros o IgG durante diferentes períodos de tiempo. Luego se reemplazó el medio por medio fresco y se agregaron 20 μl de medio que contenían 10.000 cpm de [^3H]-timidina a cada pocillo. Las células se cultivaron por 48 horas a 37°C , se lavaron con PBS y se lisaron en 200 μl de NaOH 0,2 M. El contenido de cada pocillo se agregó a 1 ml de solución de centelleo biodegradable. Los resultados se expresaron como porcentaje de estimulación o inhibición de la incorporación de [^3H]-timidina con respecto al control (células sin tratamiento).

Ensayos de desplazamiento de la unión de [^3H]-QNB

Se realizaron ensayos de desplazamiento de la unión del antagonista muscarínico tritiado [^3H]-QNB con distintas concentraciones de la IgG purificada del suero de portadores de Tp, TG y como control se utilizó IgG normal. Las células se cultivaron en placas de 48 pocillos a 25°C durante 90 minutos en medio MEM con agitación en ausencia o en presencia de las fracciones IgG, AT o AF-DX116 (antagonista muscarínico M_2 selectivo), con [^3H]-QNB 1 nM. Los resultados se expresaron como % de [^3H]-QNB unido con respecto a la unión del radioligando a células sin tratamiento, que se consideró como el 100% de unión (11).

Ensayos de inmunomarcación post electrotransferencia (Immunoblotting)

Preparación de lisados celulares

Las células LM3 (2×10^7) se cultivaron en placas de Petri de 100 mm de diámetro y luego de 2 lavados con PBS se lisaron en 1 ml de buffer Tris-HCl 10 mM, pH: 7,4; MgCl_2 5 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón X-100 1%, NaF 50 mM, e inhibidores de proteasas, durante 1 hora a 0°C . Luego de sonicar 30 segundos a 4°C , se centrifugaron durante 20 minutos a 10000 rpm. La concentración de proteínas en los sobrenadantes se determinó por el método de Lowry (10) y los mismos se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Preparación de homogenatos de tumor y corazón

Los tumores se extirparon quirúrgicamente y se homogeneizaron en buffer: Tris 20mM, pH 7,4; EGTA 10 mM, EDTA 10 mM, glicerol 10% v/v, ditiotretitol 1 mM, e inhibidores de proteasas, con un Ultraturrax a velocidad baja, media y alta, 30 segundos cada vez y se sonicaron durante 40 segundos.

Los homogenatos de corazón se obtuvieron en buffer RIPA modificado: NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH: 7,4; EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Triton X100 1%, deoxicolato de sodio 1%, SDS 0,1%; aprotinina y leupeptina 5 ug/ml. Los homogenatos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Los lisados celulares y homogenatos tratados o no con AT 10^{-5} M, se diluyeron 1:4 en buffer muestra y se sembraron 30 ug de proteína por calle en minigeles de poliacrilamida con SDS al 7,5% y se sometieron a electroforesis (*SDS-PAGE*). Luego, las proteínas fueron transferidas por el método semiseco a una membrana de nitrocelulosa. La eficiencia de la transferencia se verificó por tinción de las membranas con rojo Ponceau. Después de lavar con agua bidestilada, las membranas se incubaron en buffer de bloqueo Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0,05%, leche descremada 5% (TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con los sueros o IgG provenientes de animales normales o portadores de Tp o TG. Como control positivo se utilizó un Ac monoclonal contra el receptor M₂ murino (Abcam Co.). Luego de lavar con TBST, se incubaron con el segundo anticuerpo anti IgG murina hecho en conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora a 37°C. Las bandas se visualizaron con NBT/BCIP y se cuantificaron por densitometría. Los resultados se expresaron en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm²) (11).

Inmunofluorescencia indirecta

Se incubaron 5×10^5 células LM3 en PBS con 0,5% leche descremada en polvo y se centrifugaron 5 minutos a 2000 rpm. Se agregó al pellet suero o IgG de portadores de TG (1mg/ml o 0,7mg/ml respectivamente) y se incubaron por 1 hora a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS, 0,5% leche descremada en polvo y se incubaron con buffer PBS, 5% leche descremada en polvo por 45 minutos. Luego se agregó un anticuerpo anti IgG murina conjugado con fluoresceína (Santa Cruz Biotechnology) (5 ug/ml) y se incubaron por 45 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se

observaron en microscopio de fluorescencia con un aumento de 100 veces y se fotografiaron con un cámara digital Nikon.

Angiogénesis inducida por células tumorales

Las células LM3 (2×10^6) se resuspendieron en 1 ml de MEM y se trataron durante 1 hora con IgG purificada de suero normal o de portadores de Tp o TG en ausencia o en presencia de AT (10^{-6} M). Luego se lavaron con medio fresco y se inyectaron (2×10^5 cél./0,1 ml) por vía intradérmica con azul Trypan, para visualizar el sitio de inoculación, en ambos flancos de ratones BALB/c normales. Los ratones receptores de las células se sacrificaron con éter cinco días después de la inoculación y la respuesta vascular se evaluó en la cara interior de la piel con lupa (aumento 6,4 X). El método utilizado para cuantificar la respuesta angiogénica se basó en la determinación de la densidad de vasos (δ) expresada como número de vasos por mm^2 de piel de ratón, según el criterio de Auerbach modificado (12).

Resultados

Modulación colinérgica de la proliferación de células LM3 por el suero y la IgG de portadores del tumor LM3

Teniendo en cuenta que las células LM3 sobreexpresan RCM, investigamos la capacidad de estas proteínas de actuar como Ags desencadenando una respuesta inmune humoral en portadores de tumor. Realizamos curvas concentración-respuesta con los sueros (0,5-10 mg/ml) o las IgG (0,0025-0,025 mg/ml) agregados al cultivo durante distintos períodos de tiempo. Las concentraciones efectivas máximas de los sueros e IgG fueron 2 mg/ml y 0,025 mg/ml respectivamente para un tiempo de tratamiento de 1 hora. Observamos que el suero de los portadores de Tp estimula significativamente la proliferación de células LM3 en un 163% con respecto al basal (células sin tratamiento). Este efecto fue reducido por el pretratamiento de las células con AT 10^{-5} M. (Fig.1A). El tratamiento de las células con la IgG purificada del suero de portadores de Tp produjo un estímulo de igual magnitud (164%) en la proliferación celular que también se redujo significativamente con la misma concentración de AT. El tratamiento de las células LM3 con el suero de TG produjo un efecto inhibitorio no significativo de la proliferación (-

12%) que fue revertido a estimulante por el pre-tratamiento de las células con AT, mientras que la IgG purificada del suero de TG inhibió significativamente (37%) la proliferación celular (Fig. 1B).

El tratamiento con suero o IgG proveniente de hembras BALB/c normales estimuló la proliferación celular aproximadamente en un 41% y 25% respectivamente. La AT no modificó significativamente ninguno de los dos efectos.

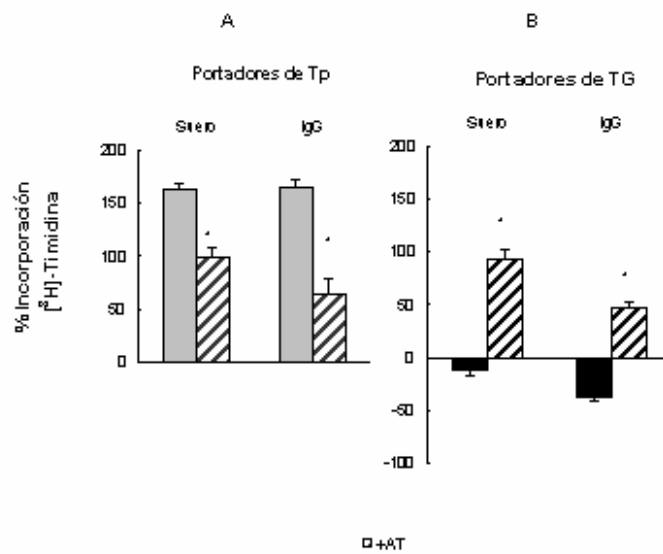


Figura 1 Efecto del tratamiento de células LM3 con suero e IgG de portadores de (A) tumor pequeño (Tp) y (B) tumor grande (TG). Las células LM3 se trataron durante 1 hora con los sueros (2 mg/ml) o IgG (0,025 mg/ml), luego el medio se reemplazó por medio fresco conteniendo timidina tritiada (³H-Timidina) y se midió la proliferación después de 48 horas de cultivo como porcentaje de incorporación de ³H-Timidina con respecto al control (células sin tratamiento). Los valores son promedios ± E.S de 3 experimentos realizados por duplicado. *p<0.05

Desplazamiento de la unión del antagonista muscarínico [³H]-QNB por la IgG purificada del suero de portadores de tumor

Para confirmar la interacción de la IgG purificada del suero de portadores de Tp y TG con los RCM expresados en células LM3 realizamos ensayos de desplazamiento de la unión de [³H]-QNB. Como control positivo realizamos desplazamientos con concentraciones crecientes de AT y

AF-DX116, antagonista selectivo del receptor M_2 que se expresa mayoritariamente en las células LM3. En la Figura 2 A se muestra que tanto la IgG purificada de portadores de Tp como de TG desplaza en forma dependiente de la concentración la unión del radioligando muscarínico. La IgG normal no modificó la unión de [3 H]-QNB a células LM3. Los ensayos de desplazamiento con concentraciones crecientes de AT o AF-DX116 confirmaron la expresión mayoritaria del subtipo M_2 en estas células (Fig. 2B). Se observa que el efecto de la IgG de portadores de tumor es análogo al que produce una concentración 10^{-7} M de los antagonistas AT y AF-DX116.

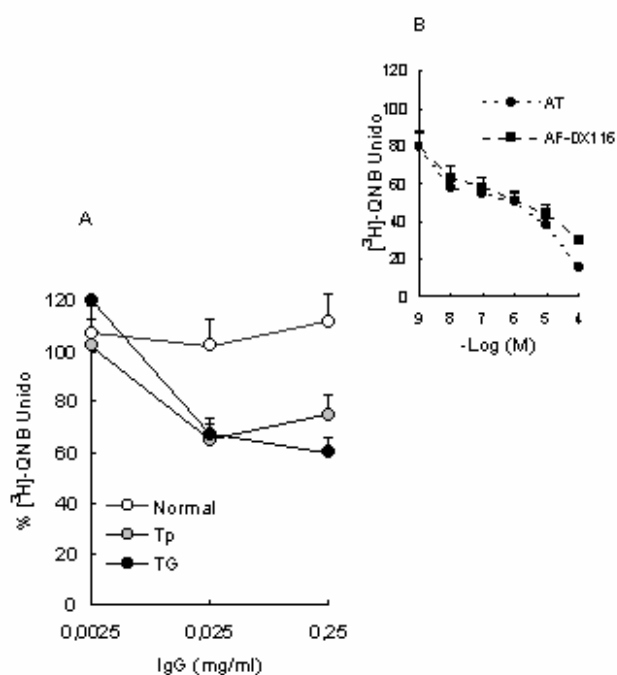


Figura 2. Ensayos de desplazamiento de la unión de [3 H]-QNB. Las células LM3 se incubaron con el radioligando en una concentración 1 nM en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de: **(A)** IgG purificada del suero normal, o de portadores de tumor pequeño (Tp) o grande (TG); **(B)** atropina (AT) y AF-DX116. Los valores son promedios \pm E.S. de 3 experimentos realizados por duplicado.

Immunomarcación de los RCM por IgG de portadores de tumor

Realizamos ensayos de inmunomarcación (immunoblotting) utilizando como primer anticuerpo los sueros o IgG obtenidos de portadores de Tp y TG sobre homogenatos de tumor LM3 (Fig. 3A) y lisados de células LM3 (Fig. 3B) previamente tratados o no con AT 10^{-5} M. En la

Figura 3 A se observa que la IgG purificada del suero de portadores de Tp y TG reconoce una banda cuyo peso molecular es aproximadamente 70 kDa en homogenatos del tumor LM3, que se reduce por el pre-tratamiento con AT. En la Figura 3 B se muestra el resultado de un ensayo de inmunomarcación realizado sobre lisados de células LM3 que confirma que el suero e IgG obtenidos de portadores de TG detecta una proteína expresada por las células tumorales cuyo peso molecular coincide con el del receptor M₂ en dichas células. Asimismo, las IgG purificadas del suero de portadores de Tp y TG reconocen al receptor M₂ que se expresa mayoritariamente en corazón murino y también es reconocido por el Ac anti M₂ como control positivo (Fig. 3 C). Por inmunofluorescencia indirecta se observa que tanto el suero como la IgG purificada de portadores de TG dan una imagen positiva de fluorescencia con localización preponderante en la membrana de células LM3 (Fig. 4 A y B).

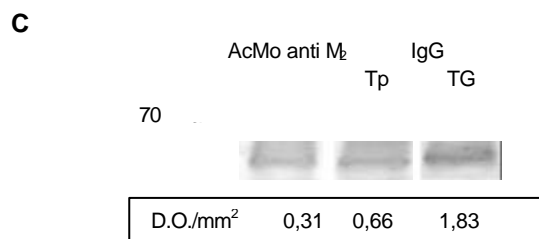
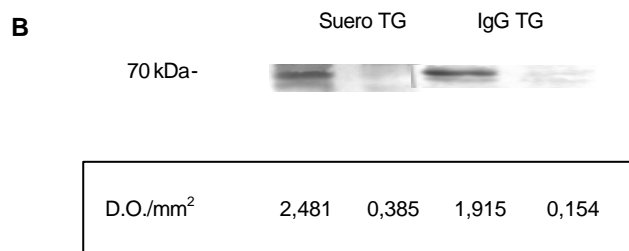
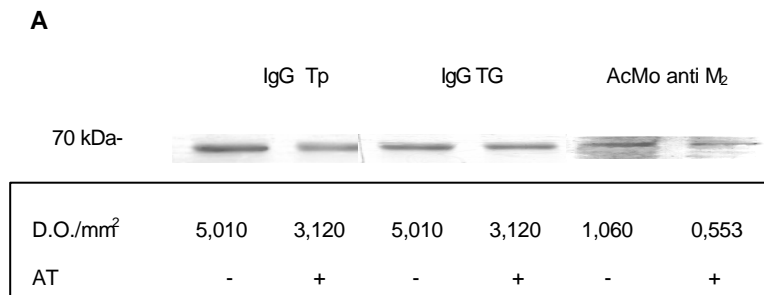


Figura 3. (A) Ensayo de Western blot sobre tumor LM3. Los homogenatos de tumor tratados o no con atropina (AT) 10^{-5} M, fueron inmunomarcados con IgG proveniente de sueros de portadores de tumor pequeño (Tp) y tumor grande (TG) o con un anticuerpo monoclonal anti M_2 . **(B)** Ensayo de Western blot sobre lisados de células LM3 que fueron tratados o no con atropina (AT) 10^{-5} M y fueron inmunomarcados con suero e IgG proveniente portadores de tumor grande (TG). **(C)** Ensayo de Western blot sobre homogenatos de corazón murino. La IgG purificada de portadores de Tp y TG inmunomarca una proteína de 70 kDa que también es reconocida por un anticuerpo monoclonal contra el receptor M_2 . El peso molecular de las bandas se indica a la izquierda. Las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresan en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm²). Se muestra un ensayo representativo de 3 realizados.

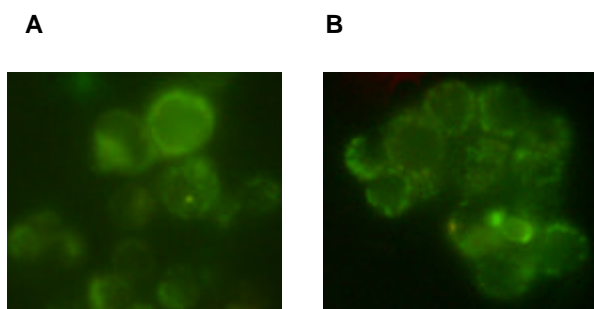


Figura 4. Inmunofluorescencia indirecta en células LM3 en suspensión. **(A)** Suero de portadores de tumor grande (TG) (1mg/ml) y **(B)** IgG purificada del suero de portadores de TG (0,7 mg/ml). Se utilizó un segundo anticuerpo anti IgG murina conjugado con FITC. Aumento 100X.

Modulación de la angiogénesis tumoral por IgG de portadores de tumor LM3

Teniendo en cuenta que las fracciones IgG purificadas de los sueros de portadores de Tp y TG tienen efectos opuestos sobre la proliferación de células LM3, estudiamos la capacidad de dichos Acs para modular la angiogénesis, etapa fundamental en la progresión tumoral. En la Figura 5 A se observa que a pesar de que la IgG purificada de portadores de Tp y TG estimula la respuesta angiogénica (δ) (IgG Tp: $3,50 \pm 0,60$; IgG TG: $3,60 \pm 0,05$) ($n=3$) inducida por células LM3 sin tratamiento (basal: $2,01 \pm 0,64$) ($n=3$), los efectos no fueron significativamente distintos de los producidos por IgG normal ($3,72 \pm 0,50$) ($n=3$). La preincubación de las células LM3 con AT 10^{-5} M redujo significativamente sólo el efecto de la IgG proveniente de portadores de TG. En la Figura 5 B se muestra un control negativo de piel normal sin tratamiento ($1,65 \pm 0,14$; $n=9$), en 5 C la

respuesta positiva de células LM3 sin tratamiento y el efecto de células tratadas con IgG obtenida de portadores de TG en 5 D.

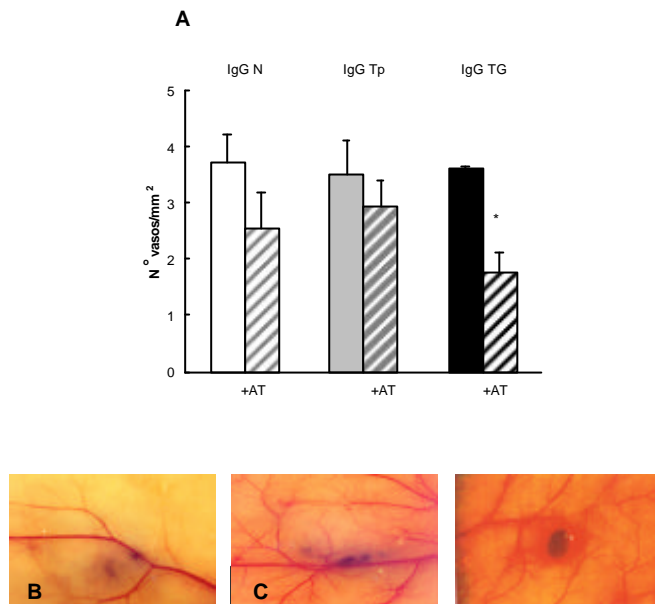


Figura 5. Ensayo de angiogénesis inducida por células tumorales. **(A)** Las células LM3 (2×10^5) se inocularon en forma subcutánea en hembras BALB/c, luego de ser tratadas con IgG (0,025 mg/ml) purificada de animales normales (IgG N) o de portadores de tumor pequeño (Tp) o tumor grande (TG) en ausencia o en presencia de atropina (AT) (10^{-5} M). Luego de 5 días se sacrificaron los animales y se cuantificó la densidad de vasos en la cara interna de la piel en el sitio de inoculación. * $p < 0,05$ **(B)** piel normal (sin tratamiento) **(C)** piel inoculada con células LM3 **(D)** piel inoculada con células LM3 tratadas con IgG TG. Magnificación 6,4X.

Discusión

Se han realizado varios intentos por demostrar la presencia de Acs específicos contra Ags tumorales en pacientes con cáncer, pero los resultados son aún contradictorios. Durante la década del '80 se sugirió que los linfocitos B de pacientes portadores de tumor no eran capaces de desarrollar una respuesta inmune humoral anti-tumor. Más aún se afirmaba que estas células no desempeñaban ningún rol en la progresión tumoral (3). Sin embargo, recientemente se describió la presencia de Acs en pacientes con distintos tipos de tumores que reconocen Ags tumorales y que pueden vincularse con síndromes paraneoplásicos, lo que indica una respuesta policlonal,

multifuncional en estos pacientes (13-15). Debe tenerse en cuenta que las proteínas sobre-expresadas en células tumorales, podrían estar actuando como Acs desencadenando una respuesta inmune humoral en portadores de tumor. Este podría ser el caso de los portadores del tumor LM3, cuyas células derivan del adenocarcinoma mamario murino M3 y sobre-expresan receptores M_2 en comparación con las células de mama murina normal NMuMG (8). Nosotros demostramos que tanto el suero, como la IgG de portadores murinos tempranos y tardíos de tumor modulan la proliferación de células LM3 por vía muscarínica pues el efecto se reduce significativamente por el pretratamiento con el antagonista muscarínico AT. Previamente demostramos que la estimulación de RCM con el agonista muscarínico carbacol (CARB), promueve la proliferación de células LM3, con aumento de la actividad de las enzimas fosofolipasa C y óxido nítrico sintasa neuronal (11). En este sentido los autoAcs estarían ejerciendo un efecto semejante al del agonista, promoviendo la proliferación y favoreciendo el crecimiento tumoral. *Wen y col.* investigaron el papel de Acs humanos en pacientes con cáncer de mama e informaron la presencia de fragmentos Fab que reaccionan con Acs expresados en tumores primarios de mama, estimulando la proliferación de células tumorales de igual estirpe MDA-MB-231 y MCF-7, con participación de la vía ERK2 (16). También se ha descrito la presencia de Acs anti-RCM en pacientes con otras patologías crónicas como miocardiopatías y exocrinopatías; estos Acs activan receptores M_2 y M_3 , desencadenando señales de transducción que ejercen efectos parasimpaticomiméticos, agravando las condiciones de los pacientes (17,18).

Por el contrario la IgG de portadores de TG inhibe la proliferación celular y el bloqueo muscarínico revierte el efecto inhibitorio en estimulante. Estos resultados indican la presencia de una fracción de Acs contra RCM con capacidad inhibitoria y otra fracción capaz de estimular la proliferación por una vía no colinérgica, cuyo efecto sea tal vez preponderante en portadores tardíos. Esta fracción estimulante estaría presente no sólo en portadores de Tp sino también en el suero de animales normales, puesto que tanto el suero como la IgG normal estimulan significativamente la proliferación.

Además demostramos la interacción de los Acs provenientes de portadores de Tp y TG con los RCM presentes en células LM3 pues estos desplazan significativamente la unión del

radioligando muscarínico [³H]-QNB. La IgG normal no fue capaz de desplazar la unión del radioligando en ninguna de las concentraciones ensayadas lo que confirmaría que la estimulación de la proliferación de células LM3 inducida por esta fracción es un efecto no colinérgico.

Previamente demostramos que la población de receptores M₂ es mayoritaria en las células LM3 (11). Por ensayos de Western blot observamos que tanto el suero como la IgG de portadores de tumor reconocen estos receptores expresados sobre células tumorales y corazón murino, pues las fracciones IgG inmunodetectan una proteína cuyo peso molecular coincide con la que reconoce un Ac monoclonal específico contra el receptor M₂.

A pesar de que la IgG purificada de portadores de TG inhibió la proliferación *in vitro* de células LM3, se observa que el tumor continúa creciendo *in vivo*, indicando que existen otros mecanismos que sostienen la progresión tumoral. Por esto investigamos la participación de los Acs anti RCM en la angiogénesis inducida por células tumorales. Observamos que si bien el efecto estimulante de la IgG de portadores de TG sobre la neovascularización no fue significativamente distinto del que producen la IgG normal o de portadores de Tp, el mismo fue inhibido por AT, indicando la participación de la vía muscarínica en el proceso angiogénico. Previamente demostramos que el tratamiento de células LM3 con CARB potencia la respuesta neovascular *in vivo* inducida por dichas células, efecto que se revierte en presencia de AT o metoctramina, antagonista M₂ (19). Es posible que exista un mayor título de Acs anti RCM en los portadores tardíos o que se modifique la especificidad por el subtipo M₂, aumentando la proporción de Acs contra este subtipo, involucrado principalmente en la angiogénesis inducida por células LM3. Estamos realizando nuevos experimentos para demostrar esta hipótesis.

Concluimos que los portadores del tumor LM3 poseen autoAcs contra RCM con distinta actividad biológica según el estadio del tumor. Los portadores tempranos presentan en el suero autoAcs que reconocen a los RCM y estimulan la proliferación celular; efecto que disminuye significativamente por el tratamiento con AT. Esta reacción autoinmune favorecería el crecimiento del tumor en esta etapa inicial. Los portadores tardíos también presentan autoAcs que reconocen a los RCM. A pesar de que esta fracción tiene actividad inhibitoria sobre la proliferación de células LM3, promovería el crecimiento tumoral al estimular la angiogénesis.

Referencias

1. Jakóbiśiak M, Lasek W, Golab J. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunology Let* 2003; 90: 103-122.
2. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994;12: 337-66.
3. Manson L.A. Anti-tumor immune responses of the tumor bearing host: the case for antibody mediated immunologic enhancement. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 72: 1-8.
4. Witkin, S.S. Heat shock protein expression and immunity: relevance to gynecologic oncology. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2001; 22:249-56.
5. Karim AR, Hughes RG, Winer JB, Williams AC, Bradwell AR. Paraneoplastic neurological antibodies: a laboratory experience. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1050: 274-85.
6. Gautier F, Irminger-Finger I, Gregoire M, Meflah K, Harb J. Identification of apoptotic product of BARD1 as an autoantigen: a potential factor in the antitumoral response mediated by apoptotic bodies. *Cancer Res* 2000; 60: 6895-900.
7. Hansen MH, Nielsen H, Ditzel HJ. The tumor infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12569-664.
8. Español A, Eiján AM, Mazzoni E, Davel L, Jasnis MA, Sacerdote de Lustig E, Sales ME. Nitric oxide synthase, arginase and cyclooxygenase are involved in muscarinic receptor activation in different murine mammary adenocarcinoma cell lines. *Int J Mol Med* 2002; 9: 651-7.
9. Urtreger AJ, Ladedá VE, Puricelli LI, Rivelli A, Vidal MC, Lustig ES, Bal de Kier Joffé E. Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two murine mammary tumor cell lines. *Int J Oncol.* 1997; 11: 489-96.
10. Lowry O, Rosenbrough N, Randall R, Farr A. Protein measurement with Folin phenol reagents. *J Biol Chem* 1971; 193: 265-68.
11. Español A, Sales ME. Different muscarinic receptors are involved in the proliferation of murine mammary adenocarcinoma cell lines. *Int J Mol Med*, 2004, 13:311-17.

12. Davel L, Español AJ, de la Torre E, Jasnias MA, Ribeiro ML, Gotoh T, Sacerdote de Lustig E, Sales ME. Different mechanisms lead to angiogenic process in three tumor cell lines. *Angiogenesis* 2004; 7:45-51.
13. Bazhin AV, Shifrina ON, Savchenko MS, Tikhomirova NK, Goncharskaia, MA, Gorbunova VA, Senin II, Chuchalin AG, Philippov PP. Low titre against recoverin in sera of patients with small cell lung cancer without a loss of vision. *Lung Cancer* 2001; 34: 99-104.
14. Antoine JC, Absi L, Honnorat J, Boulesteix, JM, de Brouker T, Vial C, Butler M, De Camilli P. Michel D. Antiampiphysin antibodies are associated with various paraneoplastic syndromes and tumors. *Arch Neurol* 1999; 56: 151-152.
15. Fernandez Madrid F, Karvonen RL, Ensley J, Kraut, M, Granda JL, Alansari H, Tang N, Tomkiel JE. Spectra of antinuclear antibodies in patients with squamous cell carcinoma of the lung and of the head and neck. *Cancer Detect Prev* 2005;29: 59-65.
16. Wen YJ, Mancino A, Pashov A, Whitehead T, Stanley J, Kieber-Emmons T. Antigen binding of human IgG Fabs mediate ERK-associated proliferation of human breast cancer cells. *DNA Cell Biol.* 2005; 24:73-84.
17. Wang W, Guo G, Tang J, Li J, Zhao R, Hjalmarson A, Michael Fu L.X. Stimulatory activity of anti-peptide antibodies against the second extracellular loop of human M2 muscarinic receptors. *Chin Med J (Engl).* 2000; 113:867-71.
18. Humphreys-Beher MG, Brayer J, Yamachika S, Peck, AB, Jonsson R. An alternative perspective to the immune response in autoimmune exocrinopathy: induction of functional quiescence rather than destructive autoaggression. *Scand J Immunol.* 1999; 49:7-10.
19. Español AJ. Davel L, Jasnias MA, Ribeiro ML, Sacerdote de Lustig E, Sales ME. La proliferación, la angiogénesis y el crecimiento tumoral son modulados por el sistema nervioso autónomo parasimpático. *Medicina* 2002; 65:512-513.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Universidad de Buenos Aires, subsidio UBACYT MO04, Programación Científica 2004-2007.

Correspondencia a:

Prof. Dra. María Elena Sales

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-CONICET

Paraguay 2155 Piso 16 Sector Derecho

Buenos Aires-Argentina

TE-FAX: 011-4508-3680

e-mail: mesales@2vias.com.ar



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

Revista **QuímicaViva**
Número 3, año 4, diciembre 2005
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar