



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 5, diciembre 2006

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Entrevista a Adrián Paenza

“Es una tarea nuestra, de los comunicadores, explicar la importancia de la ciencia para generar un país independiente”

Por Susana Gallardo

[Versión para imprimir](#) 

Adrián Paenza es doctor de Ciencias Matemáticas, egresado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, y fue profesor del Departamento de Matemáticas de esa Facultad. Posee una gran trayectoria en los medios televisivo, radial y gráfico. Actualmente colabora en *Veintitres* y *Página 12*. Fue conductor de programas deportivos en televisión, columnista de “Día D” y “Detrás de las noticias”, y conductor de “Periodistas”. Actualmente conduce “Científicos, Industria Argentina”. Recibió el Premio Martín Fierro en varias oportunidades por sus trabajos en el periodismo dedicado al fútbol, al basketball, a la política y también a la ciencia. Publicó el libro *Matemática...estás ahí?*, que vendió 120 mil ejemplares, y acaba de salir la segunda parte (Episodio 2), con una tirada de 40 mil copias.

QuímicaViva: ¿Qué fue primero, la pasión por el periodismo deportivo o por la matemática?

Adrián Paenza: Es una pregunta difícil de contestar, sobre todo porque no sé la respuesta. Intuyo que estuvo todo ligado, incluso otras áreas, como la música, por ejemplo, pero en esencia yo hacía (hice/hago) muchas cosas, que sólo manifiestan partes de lo que me interesa o de lo que soy.

QV: ¿Qué le ha brindado mayores satisfacciones, el periodismo deportivo, el periodismo científico, o la actividad docente y de investigación?

AP: No, así planteado me resisto a contestarlo. ¿Cómo podría graduar yo 'las satisfacciones'? Hoy podría contestar algo, con lo que no creo que estuviera de acuerdo en otro momento de mi vida. En todo caso, la respuesta es que 'no tengo respuesta'.

QV: ¿Ha tenido dedicación exclusiva en la ciencia, o siempre compartió el tiempo con otras actividades?

AP: Hubo un momento de mi vida en el que me dediqué exclusivamente a la investigación, que fueron los años en los que hice las materias de doctorado, enseñaba Topología y Análisis Complejo, y terminamos (junto a Néstor Búcarí) por escribir nuestras tesis.

QV: ¿En qué temas de la matemática ha trabajado?

AP: En varios, pero esencialmente en variables complejas y topología diferencial.

QV: ¿Ha dirigido trabajos de tesis? ¿tiene discípulos?

AP: He dirigido algunos trabajos de tesis de licenciatura, pero mi carrera como investigador es pobre y en todo caso, no creo que ninguno haya seguido mis pasos. Y si lo hizo, debería revisar su decisión.

QV: Actualmente está haciendo docencia en el exterior, ¿dónde precisamente?

AP: Yo no hago 'docencia' en el sentido estricto. Soy profesor de la UBA en uso de licencia y no 'enseño' como lo hago (o hice) cuando estoy (estaba) aquí. De todas formas, sí doy muchas charlas y seminarios sobre la didáctica de la matemática.

QV: ¿Qué diferencias encuentra entre los distintos ámbitos educativos en los que ha trabajado?

AP: En la Argentina, las universidades nacionales tienen una capacidad para producir científicos y trabajos que están en la frontera del conocimiento. Teniendo en cuenta las condiciones en las que se desarrollan (edilicias, de presupuesto, de mantenimiento, en tecnología), es un verdadero milagro. La universidad privada en la Argentina no produce investigadores reconocidos a nivel mundial *en la cantidad y calidad* que las universidades estatales.

QV: ¿Y a partir de su experiencia en el exterior?

AP: Depende de la facultad y del país. No es lo mismo la Universidad de Chicago que la Universidad Nacional del Perú, pero, obviamente, ni el presupuesto ni las condiciones en las que se desarrollan las hacen comparables. En todo caso, es más meritorio lo que generan los limeños por la obvia falta de recursos y asistencia que tienen, bien parecidas a las nuestras. La Universidad de Chicago es privada y tiene un soporte de la sociedad que aquí no existe. Es esperable que sean mejores. Se preparan para eso. El problema es que sólo acceden a ese nivel aquellos que pueden afrontarlo económicamente. Y yo soy un gran defensor de la educación pública, gratuita y laica, obligatoria en los niveles primario y secundario, pero que sea una opción genuina para quienes quieran dedicarse a hacer estudios terciarios.

QV: ¿A qué se debió el cambio del periodismo deportivo al periodismo de ciencia?

AP: Yo dejé el periodismo dedicado al deporte porque 'me empujaron por la ventana'. En algún lugar, me hicieron un favor. En el medio, antes de hacer lo que hago hoy, estuve involucrado en el periodismo político y me sentí muy cómodo allí también. No descarto que vuelva a él, sólo dependerá de encontrar las circunstancias adecuadas.

QV: En el Centro de Divulgación Científica de Exactas se hizo una encuesta para saber qué factores influyen en la decisión de dedicarse a la ciencia, y se vio que la divulgación cumple un rol destacado. En su caso, ¿qué factor señalaría como decisivo o influyente?

AP: Esta es una época particular para la ciencia, o mejor dicho, para la divulgación de la ciencia, porque han aparecido muchas ofertas que en otra época no existían: colecciones de libros (*Ciencia que Ladra*, que dirige Diego Golombek, las colecciones de Pepe Nun y Leonardo Moledo), los diarios nacionales que ofrecen páginas con gente dedicada a la difusión *todos los días*, como Nora Bar en La Nación, Leonardo Moledo en Página 12, la gente de Clarín. Las obras de teatro como *Copenhage*, *La Prueba* o *Galileo*, o películas como *Una Mente Brillante* y también *La Prueba*, por sólo nombrar algunos.

QV: Y también su programa, Científicos Industria Argentina ...

AP: Sí, ya lleva cuatro años en la televisión abierta, y también el programa de ciencia de TN, además de algunos canales que llegan del exterior, como el Discovery Channel, National Geographic, The Animal Planet... como se ve, hay un universo de alternativas que antes no existían. Eso, inexorablemente, genera una masa crítica de gente que es seducida por lo que ve, lee y escucha.

QV: El descenso en la matrícula de carreras de ciencias exactas y de ingeniería, ¿a qué lo atribuye: al contexto económico de los 90, a la actitud de los medios, que parecen priorizar lo rápido y efectivo?

AP: Es algo pendular. No sé a qué atribuírselo, pero en todo caso, me gustaría esperar algunos años antes de sacar conclusiones de ese tipo. La demanda de gente dedicada a informática, aviónica, criptografía, biología molecular, física de partículas, robótica, me hace pensar que en un futuro no muy lejano esa tendencia tendría que modificarse.

QV: ¿Tal vez por estar en contacto con directivos de los medios, que son quienes orientan la programación, ¿conoce qué argumentos exponen acerca de esas decisiones, más allá de los puntos de audiencia?

AP: No conozco que expongan ningún argumento que no sea el *rating*.

QV: ¿Considera que los medios tienen alguna responsabilidad en orientar las vocaciones de los jóvenes?

AP: Los medios son sólo una parte de la sociedad. Adjudicarles responsabilidad significa que uno tiene control sobre ellos, y eso no es así. El peso recae sobre el Estado. El resto es una decisión privada. Cuanto más educada esté la sociedad en la que nos desenvolvemos, mayor será la demanda por más calidad.

QV: ¿Significó mayor audiencia el traspaso de Científicos Industria Argentina Canal 7 a Telefé?

AP: Tanto cuando acordé el contrato con Canal 7 como con la gente de Telefé, quedó claro que taxativamente no me importaba el *rating*. Y así fue. Ahora terminamos la cuarta temporada en el aire, dos años en cada canal y es probable que volvamos al canal estatal, y justamente, si tomamos esa decisión, no estará basada en el *rating*.

QV: ¿Se tienen datos respecto de la audiencia: cantidad de televidentes y sectores sociales?

AP: No creo que lo hagan con nuestro programa, pero en todo caso, yo nunca me preocupé en averiguarlo. Pero supongo que alguien debería hacerlo para que nuestras decisiones en cuanto al tipo de programa que hacemos sean más adecuadas.

QV: ¿Por qué se acortó el programa (de una hora a media)?

AP: Porque a Telefé le pareció que eso beneficiaría su lucha por el *rating*. Quizás por eso es que piense en sacar el programa de Telefé, aunque en principio pudiera ofrecer mucho más *rating*. Como dije antes, el *rating* del programa no puede ser una variable de ajuste.

QV: ¿Cuánto cree que influyó en el éxito de su libro *Matemática ¿estás ahí? el ser conocido por sus programas de televisión?*

AP: Supongo que tiene que haber influido, pero no tengo idea de las proporciones. Igualmente, no ignoro que la notoriedad que me da haber estado en los medios por más de cuarenta años favorece la llegada a la gente.

QV: ¿Qué significa la aparición de la segunda parte?

AP: La continuidad de un proyecto que se ha transformado en uno de los más importantes de mi vida. Y ahora vamos por el tercero.

QV: ¿Cree que alguien que no tiene formación en matemática podría divulgarla?

AP: Esa es una interesante pregunta, pero no sabría contestarla porque no hay antecedentes que yo conozca. Pero eso sólo marca una limitación de mi parte, porque quizás sí existan personas que lo han hecho y es posible que con éxito, pero si es así, yo no conozco las experiencias. Igualmente, me parece que para poder explicar algo de matemática en profundidad, colabora fuertemente el haber tenido una formación al menos en alguna de las ciencias llamadas *duras*.

QV: Para que los conocimientos científicos puedan alcanzar a todos los sectores de la población ¿qué cree que se puede hacer?

AP: Es una tarea del Estado, indelegable: la formación de educadores y docentes, que no sólo puedan vivir dignamente de su sueldo, sino que accedan a un grado de excelencia en su preparación. El resto, será una consecuencia inexorable.

QV: Teniendo en cuenta el contacto que usted tiene con el público a través de un medio tan masivo como la televisión, ¿cuál le parece que es la percepción del público hacia la ciencia? ¿La ven como una peculiaridad, algo que hace una gente rara y que no se sabe bien para qué sirve?

AP: No lo sé. Hablar de 'la gente' me parece muy impreciso y allí cabe todo. Justamente 'la gente' es muy variada, y no sólo en poder adquisitivo, sino también en curiosidades, gustos e intereses. Además, como dije antes, hace 20 años todo lo que se ofrece hoy no era posible.

Ahora bien: ¿el hecho de que ahora la oferta sea tan variada en calidad y cantidad, ha mejorado la concepción que se tiene de la ciencia en general? Es una reflexión que se me escapa.

QV: ¿Le parece que la sociedad considera que la investigación científica es importante y relevante para el futuro del país?

AP: No lo sé, pero espero que sí. En todo caso, es una tarea nuestra, la de los comunicadores, explicar su importancia para generar un país independiente. Un país que no produce ciencia es, inexorablemente, esclavo de lo que importa y depende de quién le vende. Supongo que planteado de esa forma, debería ser suficiente para entender la necesidad de que la produzcamos nosotros.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 5, diciembre 2006

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 5, diciembre 2006

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Dos premios Nobel para el RNA

Paula Cramer

Investigadora del CONICET, Jefe de trabajos prácticos del Depto. de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEN, UBA

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento. de Fisiología, Biología Molecular y Celular-IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. Pabellón 2. 2do Piso. C1428EGA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

pcramer@fbmc.fcen.uba.ar

Recibido el 21/11/06. Aceptado el 5/12/06.

[Versión para imprimir](#) 

Two Nobel awards for RNA

This year, the Royal Swedish Academy of Sciences awarded its prizes in Chemistry and Physiology or Medicine to researchers working in key aspects of the regulation of gene expression. The reasons for the choice of awardees, the historical context and impact of their research are discussed.

Este año, la Academia Real Sueca de Ciencias otorgó sus premios de Química y Medicina a investigadores que trabajan en aspectos claves de la regulación de la expresión génica.

La información necesaria para la supervivencia, mantenimiento y crecimiento de nuestras células está contenida en los *genes*, compuestos de ácido desoxirribonucleico (DNA) y localizados en el núcleo. Cuando se requiere la información guardada en un determinado gen, éste se "expresa" promoviendo la generación de una copia de sí mismo compuesta de ácido ribonucleico (RNA). A este proceso de copiado se lo denomina *transcripción*. Luego de sufrir una serie de modificaciones, este RNA "*mensajero*" (mRNA) viaja fuera del núcleo hacia

el citoplasma, en donde es leído por una maquinaria que genera a partir de él una proteína. Para que se pueda producir el mRNA, los genes contienen regiones denominadas *promotores*, que son capaces de reclutar a una serie de proteínas que conforman la maquinaria de *transcripción*. Ésta básicamente reconoce el inicio del gen y es capaz de fabricar el mRNA en el momento y cantidad requeridos.

Las células de nuestro hígado son distintas de nuestras neuronas porque -a pesar de poseer la misma información genética- expresan distintos genes en distintas situaciones. Asimismo, las células normales pueden volverse tumorales cuando se altera la expresión de ciertos genes responsables de funciones esenciales tales como el control de la proliferación. *Es decir, que en la regulación de la expresión génica está la clave para entender estos procesos.*

Premio Nobel de Química 2006: Roger Kornberg

Una vida dedicada a la transcripción del RNA

El premio Nobel de Química 2006 fue otorgado a Roger Kornberg, de la Universidad de Stanford, EE.UU, quien dedicó toda su carrera científica a estudiar distintos aspectos del proceso de transcripción. Durante su postdoctorado en los años 70 descubrió los nucleosomas, mientras trabajaba con los premios Nobel Aaron Klug y Francis Crick, en el Laboratorio de Biología Molecular del Medical Research Council (MRC), en Cambridge, Reino Unido.

Los nucleosomas son estructuras formadas por unas proteínas llamadas histonas, alrededor de las cuales se empaqueta el DNA. Todo el DNA de la célula se halla empaquetado en series de nucleosomas, constituyendo la cromatina. Hoy sabemos que la regulación de la expresión de los genes está determinada en parte por la estructura de la cromatina.

Una vez en su laboratorio de Stanford, Kornberg se abocó a estudiar la maquinaria de transcripción de los eucariontes (organismos cuyo DNA se encuentra en el núcleo). Eligió como sistema de estudio a las levaduras, organismos unicelulares muy sencillos de cultivar en el laboratorio. Estas resultaron un muy buen modelo de estudio ya que la maquinaria transcripcional se encuentra en todos los organismos vivos y que hoy sabemos que con excepción de las bacterias (que carecen de núcleo) es muy similar en todos ellos.

Al mismo tiempo, muchos otros laboratorios estudiaron la maquinaria transcripcional en levaduras o en otros sistemas biológicos. Así, se estableció que ésta se compone de una serie de proteínas denominadas *factores generales de transcripción* (GTFs), que son reclutados por el promotor y que a su vez reclutan a la RNA polimerasa II (pol II), la proteína encargada de fabricar el mRNA. También se describió la existencia de otras regiones de los genes, denominadas *enhancers*, que a su vez reclutan a los *coactivadores*, proteínas capaces de estimular el reconocimiento del promotor por parte de la pol II.

Kornberg se destacó al descubrir un complejo de unas veinte proteínas, que denominó *mediador*, que asiste al reconocimiento de los promotores por parte de la maquinaria transcripcional. El mediador puede reclutar coactivadores y también represores de la transcripción (**Figura 1**). La caracterización de este complejo permitió entender el hecho de que

los *enhancers* ejercieran su efecto sobre los promotores aún a grandes distancias. En distintos tejidos, los *enhancers* reclutan distintos tipos de coactivadores y de complejos mediadores, lo cual explica en parte la expresión diferencial de tejidos de ciertos genes.

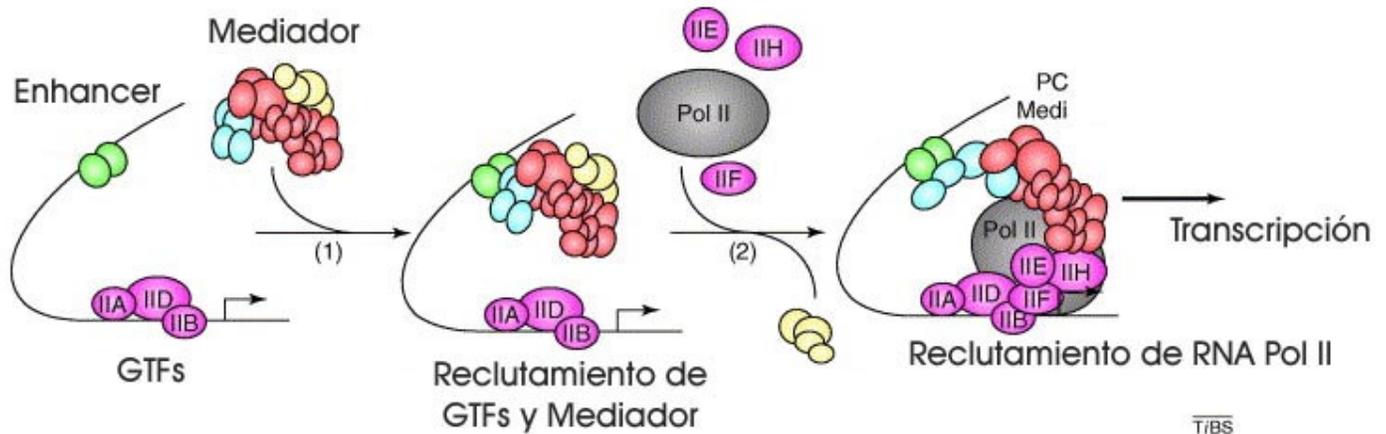


Figura 1: La maquinaria transcripcional de levaduras

El esquema representa la región del inicio del gen (línea negra). El promotor (flecha negra) recluta factores generales de transcripción (GTFs, óvalos rosas). El complejo mediador (óvalos celestes, rojos y amarillos) actúa de puente entre los coactivadores que recluta el enhancer (óvalos verdes) y los GTFs. Esto permite a la RNA polimerasa II reconocer a la región promotora del gen e iniciar la transcripción. Adaptado de (1).

Recientemente, el laboratorio de Kornberg se dedicó a obtener una imagen del proceso de transcripción en acción. Para ello, obtuvo imágenes de los complejos DNA-pol II-RNA mediante cristalografía de rayos X. Esta técnica consiste en obtener grandes cantidades del objeto de estudio muy puro, en forma de cristales, que luego se irradian con rayos X. La dispersión de los rayos al atravesar los cristales permite deducir -mediante ecuaciones- la composición de átomos de la molécula. Obtener la estructura átomo a átomo de semejante complejo macromolecular fue un logro sorprendente, comunicado por la revista Science en el año 2001, ver **Figura 2**.

¿Para qué sirve obtener una imagen del complejo en acción? No se puede entender ni manipular lo que no se conoce, y conocer los detalles de la estructura macromolecular permite no sólo explicar los efectos de ciertas mutaciones o cambios hallados en la naturaleza, sino también saber qué regiones de la pol II son claves para su interacción con el DNA y el RNA, y eventualmente seleccionar fármacos que modifiquen estas interacciones. Tales fármacos son herramientas invaluableles en el estudio de la regulación de la expresión génica y hasta podrían ser usados en terapias moleculares para tratar enfermedades humanas.

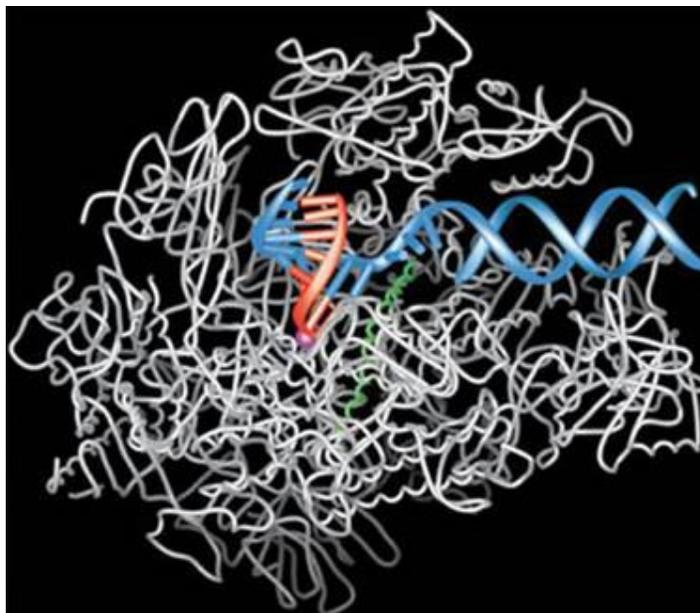


Figura 2: El complejo transcripcional en acción.

Imagen del complejo transcripcional compuesto por DNA, RNA polimerasa II y transcripto de RNA, obtenida por cristalografía de rayos X. En gris se muestra la estructura de la RNA polimerasa II, en azul, el DNA que se usa como "molde" en la transcripción, y en rojo, el RNA transcripto. Adaptado de (2).

Sin duda fue necesaria la contribución de muchísimos investigadores de diversas instituciones para alcanzar el nivel de conocimiento actual que se tiene de la maquinaria transcripcional. La Academia Sueca quizás haya querido premiar a Roger Kornberg por la dedicación de toda una vida a la transcripción, con numerosas contribuciones seminales y coronada con la imagen del complejo transcripcional en acción.

Para algunos, este premio habría sido más apropiado para la categoría Fisiología o Medicina. El comité de selección defendió su elección basándose en que la obtención de la imagen del complejo de transcripción a alta resolución

es pertinente para un premio Nobel de Química. Quizás lo que subyace a esta discusión es tan sólo el hecho de que estas categorías estancas -creadas hace más de un siglo- van perdiendo sentido a medida que la ciencia se vuelve más y más interdisciplinaria.

Es interesante destacar que Kornberg es un buen ejemplo de cómo las escuelas científicas pueden producir excelencia en forma sostenida. No sólo es hijo de otro premio Nobel (Arthur Kornberg, 1959, por el descubrimiento de la DNA polimerasa) sino que, como se mencionó antes, se formó en el MRC bajo la supervisión de científicos cuyos trabajos contribuyeron a la descripción de la estructura del DNA.

Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2006: Andrew Fire y Craig Mello

Genes silenciados, de las petunias a los gusanos

A principios de los años 90, un grupo de investigación en EE.UU y otro en Holanda estaban estudiando la ruta de biosíntesis de pigmentos en las flores de petunia. Con el fin de lograr flores de color más intenso, los investigadores generaron plantas transgénicas que debían expresar cantidades altas de la enzima clave de este camino biosintético. Sorprendidos, observaron que algunas de las petunias transgénicas eran blancas. Es decir que no sólo no fabricaban altas cantidades de la proteína en cuestión sino que, por el contrario, habían silenciado su expresión tanto a partir del transgen como del gen endógeno o propio (**Figura 3**). Por otro lado, el grupo de investigación de David Baulcombe, en el Reino Unido, demostraba que, al introducir genes virales en plantas transgénicas, se las protegía de la infección por el virus. En tanto en Roma, otros investigadores hicieron observaciones similares en el hongo *Neurospora crassa*.



Figura 3: Silenciamiento de la pigmentación de las flores

La figura muestra flores de petunias transgénicas para la chalcona sintetasa, principal responsable de la expresión de pigmentos en las flores. Las petunias originales eran de color azul oscuro. Las distintas plantas muestran diferentes grados de silenciamiento del gen. Tomado de (3).

En ese momento se desconocía el mecanismo por el cual ocurría esto, y se especulaba que el silenciamiento estaba de algún modo mediado por el RNA y que se debía a modificaciones en el DNA que alteran su interacción con las histonas.

Unos años después, estudiando la regulación de la expresión génica en el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*, Andrew Fire y Craig Mello encontraron que la inyección de RNA doble cadena correspondiente a una proteína de músculo, provocaba el mismo comportamiento que el de los gusanos que carecían totalmente del gen para la proteína en cuestión. Extendieron esta observación a muchos otros genes, concluyendo que es posible silenciar la expresión de un gen a través de la introducción del RNA doble cadena correspondiente. Aún más, este silenciamiento se dispersaba a lo largo del gusano y era heredable, según se reportó en la revista *Nature*, en 1998. Por fin se podía explicar el silenciamiento que se había observado en las plantas y los hongos. Este hallazgo proveyó de una herramienta fundamental a la genética funcional, que marcó un antes y un después, probablemente sólo comparable al de la invención de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (Polymerase Chain Reaction).

¿Para qué sirve silenciar un gen? A partir del estudio de los efectos que produce el anular la expresión de un gen puede deducirse nada menos que su función.

Dada la importancia del hallazgo no tardaron en describirse los detalles del mecanismo por el cual estos RNA bloquean la expresión génica. Mientras que el DNA de los genes está compuesto por dos hebras o cadenas de DNA complementarias, el RNA transcrito a partir de él es de simple cadena. Algunos virus generan RNA doble cadena (RNAdc) dentro de las células a las que infectan. Lo que los experimentos de Fire y Mello permitieron descubrir fue que las células infectadas detectan estos RNA de cadena doble y montan una respuesta de defensa, que termina con la degradación del RNA invasor. En esta respuesta participa la proteína Dicer, que corta el RNAdc en pequeños fragmentos de 21 a 23 nucleótidos, denominados siRNA (por small interfering RNA, en inglés), que luego son reclutados por un complejo proteico denominado RISC. Este complejo se encarga luego de utilizar la información del siRNA para silenciar específicamente la expresión del gen del cual se había originado (Figura 4).

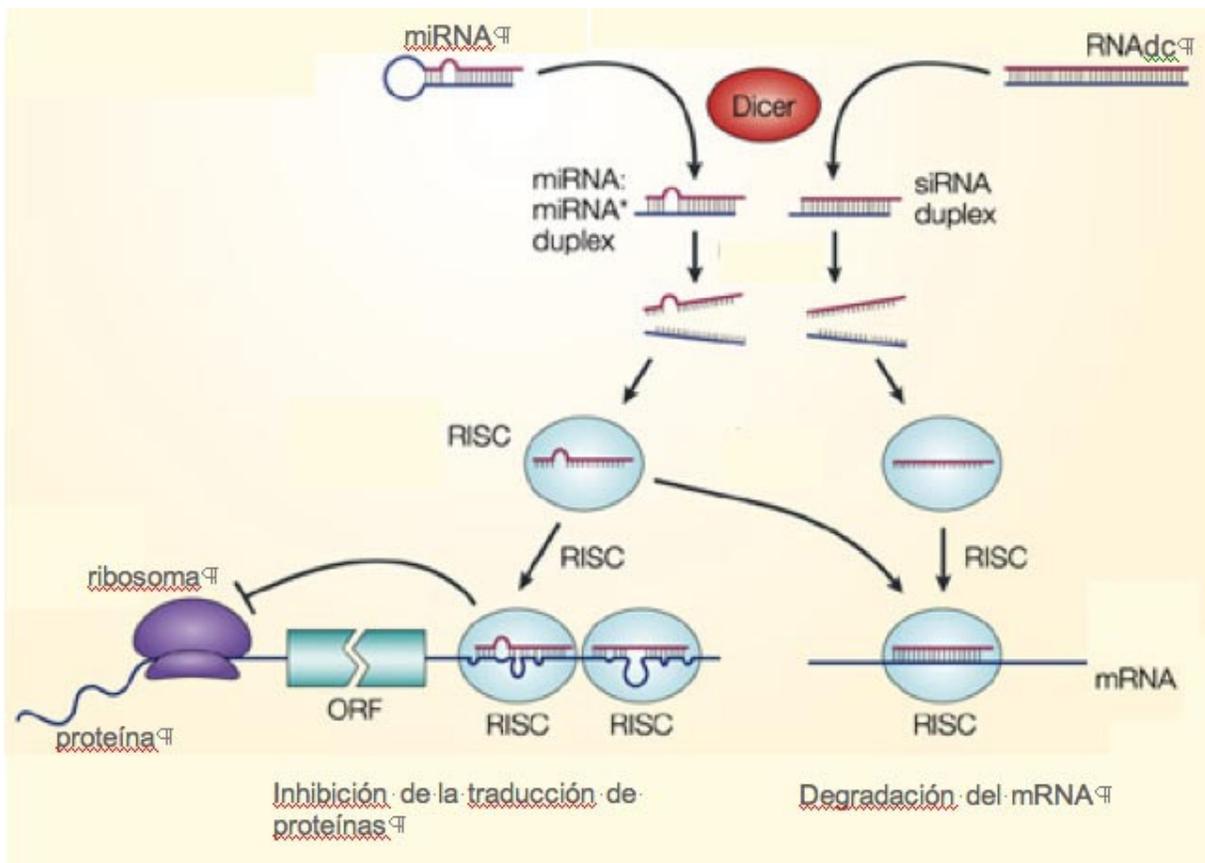


Figura 4: Los RNA pequeños regulan la expresión génica

La proteína Dicer genera siRNA pequeños a partir de microRNA propios de la célula (miRNA) o de RNA de doble cadena invasores (RNA dc). El complejo proteico RISC reconoce estos RNA pequeños e impide o la traducción de la proteína o la degradación del mRNA correspondiente a los RNA pequeños. Adaptado de (4)

En el escaso tiempo transcurrido desde los experimentos de Fire y Mello, floreció el campo de los microRNA (miRNA). Se descubrió que aparte de participar en la defensa contra infecciones virales, los RNA pequeños participan en múltiples procesos biológicos a nivel celular, inclusive en la regulación de la transcripción de los genes. Los miRNA estaban en todas partes, pero hasta hace muy poco, no sabíamos de su existencia.

Por algún tiempo no fue posible el uso de siRNA en células de mamíferos, porque disparaban la respuesta suicida de interferón de las células. Hasta que en el año 2001, el laboratorio de Thomas Tuschl, del Max-Planck-Institute de Goettingen, Alemania, encontró el modo de utilizar el RNA de interferencia en células de mamífero en cultivo. En cuestión de semanas, la técnica de siRNA se había dispersado por los laboratorios de todo el mundo. Esto permitió un progreso increíble en el estudio de la función de los genes y también promete un gran avance en terapias génicas en las que se busca, por ejemplo, silenciar algún gen involucrado en el desarrollo de tumores.

La espiral de la Historia

Si bien todos los laboratorios mencionados tienen una afiliación académica, las primeras observaciones de silenciamiento de genes se hicieron en el contexto del mejoramiento de cultivos de interés económico: la manipulación del color de las flores en Holanda, la generación de plantas resistentes a virosis. Mello y Fire estaban interesados en estudiar la regulación de la expresión génica en un nematodo cuando desentrañaron el mecanismo de silenciamiento por siRNA que resultó casi universal. Como se mencionó antes, el impacto de este hallazgo es tan profundo para quienes investigan la función de un gen como para el desarrollo de nuevas vacunas o terapias génicas.

La historia reciente de los siRNA ilustra cuán difícil es saber hacia dónde conduce un proyecto de investigación, o intentar encasillarlo en las categorías de ciencia básica o aplicada.

Referencias

1. Malik S. And Roeder R . *Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator Complex. Trends in Biochem. Sci. 2005. 30 (5): 256-263*
2. Gnatt A.L. ,Cramer P., Fu J.I., Bushnell D., Korberg R.D. *Structural Baseof Transcription. RNA polymerase II Elongation Complex at 3.2 A resolution. Science. 2001. 292 (5523):1876-1882.*
3. Napoli C., Lemieux C. and Jorgensen R. *Introduction of a Umeric Chalone Synthase Gene in Petunia Results in Reversible Co-suppresssion of Homologous Genes in Trans . Plant Cell. 1990 2: 279-289 .*

4. He, L. and Hannon, G. *MicroRNAs small RNAs with a big role in gene regulation. Nature Reviews Genetics* 2004. 5, 522–531.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 5, diciembre 2006

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 5, diciembre 2006

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Ciencia y mercado. Balance del caso Hwang

MA Ana María Vara

Centro de Estudios de Historia de la Ciencia José Babini

Escuela de Humanidades – UNSAM

E-mail: amvara@unsam.edu.ar

Recibido el 5/12/06. Aceptado el 11/12/06.

[Versión para imprimir](#) 

“La caída de Woo Suk Hwang representa quizás el caso de más alto perfil en la lamentable historia de la inconducta científica. El drama shakesperiano que implica el eclipse del biólogo celular coreano, rodeado de cortesanos adulones y complots de acólitos y enemigos, todo frente a las cámaras de televisión, ha dejado a muy pocos científicos, en cualquier disciplina, en cualquier parte del mundo, sin saber de sus circunstancias.

“Pero lo que realmente hace que el caso de Hwang sea especial es la importancia de los resultados que han sido impugnados (H.S. Hwang *et al.* *Science* **303** 1669-1674; 2004 y **308** 1777-1783; 2005). La clonación de embriones humanos que dijo haber logrado colocó a Hwang en el liderazgo de la investigación en células madre, quizás la esfera más aclamada y contenciosa de la ciencia moderna. Es también el primer caso de fraude que ocurre en la era de la biología cuidadosamente patentada, en la que los científicos pueden aspirar no sólo a la fama, sino también a la fortuna.” *Nature* [1]

Riverside - El comienzo del editorial de *Nature*, publicado a pocos días de confirmado el fraude sobre clonación terapéutica del investigador coreano Woo Suk Hwang, exhibe un tono de alarma que las publicaciones científicas reservan para ocasiones excepcionales. En perfecta síntesis, presenta una serie de elementos que contribuyeron a convertirlo en un caso difícil de olvidar: un investigador de primer nivel, admirado en el mundo y aclamado como héroe en su país; una línea de trabajo sobre la que se concentran enormes expectativas terapéuticas y económicas, a la vez que controversias éticas y políticas; dos publicaciones pioneras en uno de los *journals* más influyentes; el interés de los medios de comunicación; y la mentira. La mentira,

descubierta gracias a la preocupación de jóvenes investigadores y a la audacia rayana en el sensacionalismo de periodistas de su propio país.

¿Qué paso? ¿Cómo fue posible que *Science* no advirtiera el engaño? ¿Qué consecuencias tuvo para la investigación en clonación terapéutica, y en el trabajo en células madres embrionarias en general? ¿Cómo quedó la biotecnología coreana tras el escándalo? ¿Qué es hoy de Hwang y sus socios? En el presente artículo, revisaremos algunos de los aspectos que están detrás del caso Hwang, para comprender en qué contexto fue posible, cómo se descubrió el fraude, y qué pocas enseñanzas ha dejado. En tiempos en que la ciencia puede ser un negocio muy redituable, algo ha cambiado para que todo pueda seguir igual.

Dos primeras veces

En 2004 y 2005, el investigador coreano Woo Suk Hwang publicó en *Science* dos trabajos pioneros. En el primero, informaba haber obtenido una línea de células madres embrionarias clonadas por transferencia nuclear a partir de intentos con 242 ovocitos [2]. Súbitamente, quedaba atrás el trabajo de la empresa norteamericana *Advanced Cell Technologies*, liderado por el investigador argentino José Cibelli, cuyo primer intento de clonación humana en 2001 a partir de 19 ovocitos no había superado las primeras divisiones del embrión y que, consecuentemente, había sido publicado en una publicación de menor jerarquía, *The Journal of Regenerative Medicine* [3]. El impacto del trabajo de Hwang fue inmediato: esencialmente, venía a demostrar que, aunque difícil, era posible obtener células madre clonadas para usarlas con fines terapéuticos. Y que el secreto estaba en Corea del Sur —aunque Cibelli había sido consultado, y aparece como coautor del trabajo. Fue entonces cuando *QuímicaViva* dedicó un número a explorar los aspectos científicos y éticos de la clonación terapéutica: una puerta se abría, y había que estar preparados [4].

El elevado número de ovocitos necesarios para obtener una línea celular hacía la técnica de Hwang, todavía, muy tosca. Un segundo aspecto que ensombrecía el hallazgo estaba relacionado con éste: la extrema discreción con que los científicos coreanos se referían al origen de los ovocitos utilizados despertó algunas suspicacias. A diferencia del equipo de *Advanced Cell Technologies*, que comunicó a la prensa que había pagado como compensación por cada ciclo ovulatorio 4.000 dólares, los investigadores coreanos sostenían haber obtenido sus ovocitos de 16 donantes altruistas a través de “contactos personales”, pero no daban más detalles, ni siquiera a la inquisitiva periodista norteamericana Gina Kolata [5]. Inmediatamente se encendieron las sospechas. El *journal Nature* hizo una investigación y encontró en Seúl que grupos preocupados por los “derechos civiles” y expertos en bioética ya estaban señalando la falta de transparencia en relación con la obtención de los ovocitos. Incluso, *Nature* llegó a entrevistar a una estudiante de doctorado, coautora del artículo, quien inicialmente le comentó que había sido donante —una práctica cuestionable, dado que coloca a la potencial donante en posición de ser presionada. Declaración que luego negó, alegando su pobre comprensión del idioma inglés [6]. Con acentos premonitorios, *Nature* se refirió al problema en un editorial:

Lo último que necesitan los científicos que trabajan en clonación terapéutica es más controversias éticas. Sin embargo, una tormenta parece avecinarse sobre el artículo más prominente en este campo hasta el presente —la comunicación, en febrero, de que un grupo de Corea del Sur había logrado derivar una línea de células madre embrionarias a partir de un embrión humano clonado (W. S. Hwang *et al. Science* **303**, 1669–1674; 2004). Se alzaron voces preguntando cómo habían podido los científicos reclutar tantas mujeres preparadas para donar sus óvulos para el proyecto. Una de esas preguntas es por qué una estudiante de doctorado, coautora del trabajo, le dijo inicialmente a *Nature* que fue donante de óvulos y luego cambió su versión [7].

La respuesta fue muy tibia. Se realizó una investigación que no llegó a ningún hallazgo concluyente; y la *Korean Society of Molecular and Cellular Biology* discutió un código de ética que fue declarado oficial en octubre de 2005 [8]. El primer trabajo de Hwang, sin embargo, era insuficiente, precisamente porque la cantidad de ovocitos utilizados hablaba de una técnica ineficiente. Además, se habían utilizado ovocitos de la propia mujer clonada, lo que todavía dejaba abierta la posibilidad de que se tratara de una división por simple partenogénesis. Por eso, su segundo trabajo, publicado en mayo de 2005 también en *Science*, fue celebrado como un hito. Hwang y su equipo —al que se había asociado un prestigioso investigador norteamericano de la University of Pittsburg, Gerald Schatten, responsable de la primera clonación de un mono rhesus en 2000— informaban que habían logrado 11 líneas de células madres embrionarias utilizando sólo 185 ovocitos. Y algo más importante: las líneas estaban hechas a la medida de 9 pacientes con problemas tales como daños en la médula espinal, diabetes e hipogammaglobulinemia congénita, de donde habían sido tomados los núcleos celulares [9]. La clonación terapéutica parecía una realidad. Hwang se convirtió en una *celebrity* de la ciencia internacional. Y en Corea, confirmó su ascenso al estatus de héroe nacional: recibía premios, aparecía en una estampilla en la que un parálítico dejaba su silla, se le dio el calificativo de “científico supremo” de la nación, y se le asignó un estipendio anual de 3 millones de dólares. Se inició una campaña —“grotesca y bizarra”, según una feminista local— para promover la donación de ovocitos. También se puso en marcha una impresionante maquinaria científico-financiera: el 19 de octubre de ese año se anunció la creación de un *World Stem Cell Hub*, donde se esperaba crear unas cien líneas celulares por año, según estimaciones de Schatten, quien presidiría el *board of trustees* de la Fundación a cargo de Hub. Con base en la Seoul National University (SNU) y filiales en San Francisco y el Reino Unido —de donde llegarían ovocitos y financiación— esta fundación internacional representaba para los norteamericanos la posibilidad de sortear las restricciones del presidente George W. Bush a la investigación con células madre embrionarias, que impiden el uso de fondos federales en este tipo de investigaciones.

“Para avanzar, los científicos necesitamos un refugio seguro”, justificó Schatten en declaraciones al *New England Journal of Medicine (NEJM)*. “Las implicancias legales y éticas

son importantes, pero lo más importante es hacer descubrimientos que sean confirmados de manera independiente.” Haciendo una comparación con la historia de los trasplantes de órganos, Schatten contaba con que la oposición a la clonación terapéutica se diluiría frente a los resultados médicos. Otro científico norteamericano que pensaba colaborar con Hwang era Evan Snyder, un neurólogo que trabaja con células madre en el *Burnham Institute* de La Jolla, California. “Creo que los coreanos reconocen que la biología, en sí misma, ha avanzado más rigurosamente en los Estados Unidos”, sostuvo en el mismo artículo del *NEJM* con tono competitivo. “Pero ven esta oportunidad, porque nosotros estamos detenidos, y ellos lo convirtieron en una prioridad nacional.” Arnold R. Kriegstein, director del Institute for Stem Cell Research and Tissue Biology de la University of California en San Diego (UCSD), fue más prudente, y manifestó que, antes de incorporarse a la iniciativa, su centro esperaba a que se estandarizaran las normas bioéticas para la donación de embriones y ovocitos. Otro investigador del sistema de UC, Michael German de la University of California en San Francisco, pareció poner más el acento en las cuestiones de propiedad intelectual, al sostener que no le entusiasmaba que todo quedara “en unas pocas manos” [10].

El gobierno coreano, que ya había otorgado 65 millones de dólares al laboratorio de Hwang, prometió otros 11 millones para este emprendimiento. Estos números, sin embargo, dicen muy poco: es difícil estimar cuánto podría haber recaudado el Hub, dadas las expectativas generadas. Un poco antes de publicarse el artículo de 2005 de Hwang, las acciones biotecnológicas en Corea triplicaron su valor. En mayo de ese año, el volumen de acciones que se negociaba diariamente de la empresa MacroGen —pionera de la genómica en Corea y un importante inversor en MgenBio, una *venture* biotecnológica creada por la SNU y puesta en marcha por las investigaciones de Hwang— era superior a los 81 millones de dólares en promedio. Eso representaba alrededor de la mitad del volumen negociado por la mayor empresa coreana, Samsung Electronics, una compañía con un valor de mercado 500 veces superior al de MacroGen. Las expectativas de los enfermos eran igualmente desbordantes, y ésta es la contracara más dura del fraude: el 1 de noviembre, el primer día que se atendieron solicitudes de pacientes en el Hub, los llamados fueron 3.500 [11].

No es una locura coreana. No deben perderse de vista iniciativas similares, y las expectativas económicas y de salud que también despertaron —y siguen despertando. En las elecciones de 2004 en el estado de California los ciudadanos votaron a favor de una enmienda, la Proposición 71, para otorgar 3.000 millones de dólares en 10 años a la investigación con células madre, a través de la creación del *California Institute for Regenerative Medicine* (CIRM). Y, dado lo controvertido del tema, en previsión de que los fondos tardaran en llegar por cuestiones legales, Robert N. Klein —padre de un joven con diabetes y gestor de la iniciativa— estimaba que antes de marzo de 2006 podría recaudar unos 50 millones de dólares de particulares. En California hay muchos millonarios que temen el paso del tiempo. Entre ellos se cuenta el *entrepreneur* de los sistemas de audio Ray Dolby, quien tempranamente donó 5 millones. Nuevamente, las ganancias no serían sólo humanitarias: según estimaciones, estas investigaciones podrían dar al estado de California ingresos por *royalties* de entre 500 y 1.200

millones de dólares en 35 años [12]. Ya son varios los investigadores que se mudaron a California para aprovechar esta política de promoción. Como sostuvo un observador a mediados de 2005, “la Proposición 71 va a contribuir a configurar el futuro de la investigación con células madre en los Estados Unidos y en el mundo.[13]”

Cómo se descubrió el engaño

El comienzo del fin fue un e-mail, anterior a la segunda publicación. Según una investigación periodística de *Science*, [14] el 1 de junio de 2005, productores del programa coreano *PD Notebook*, de la cadena Munhwa Broadcasting Corp., recibieron un mensaje de un ex colaborador de Hwang que había dejado el equipo, según decía, por problemas éticos y técnicos. El mensaje puso en marcha una investigación que también tendría ribetes controvertidos. Fingiendo estar realizando un trabajo sobre la biotecnología en Corea, productores del programa entrevistaron a varios miembros del equipo de Hwang, y comprobaron que ninguno de ellos había tenido acceso a las líneas celulares. Una entrevista fue particularmente tramposa: en octubre, entrevistaron en Pittsburgh a un colaborador de Hwang, Sun Jong Kim, que estaba trabajando con Schatten. Le hicieron creer que tenían pruebas sobre el fraude, y que en Corea ya estaba en marcha una investigación judicial.

Sin saber que estaba siendo filmado, Kim reconoció que Hwang le había dado instrucciones para hacer parecer que las fotografías de dos líneas de células madre correspondían en realidad a once. La primera emisión del programa, el 22 de noviembre, denuncia la obtención inadecuada de ovocitos: no era cierto que las donaciones fueron anónimas y altruistas, como se había sostenido en los artículos de *Science*. En ese momento, Hwang renuncia a la dirección del Hub. El 2 de diciembre, los productores del programa dan una conferencia de prensa para anunciar que tienen pruebas sobre el fraude. Pero, a esta altura, ellos también habían sido denunciados —por Kim y un colega— por fallas éticas. La opinión pública local sostiene a su héroe: unos 20.000 mensajes de irritados televidentes saturan la casilla de e-mail del programa, y las amenazas bloquean las líneas telefónicas. Los más fanáticos hasta ponen fotos de familiares de los productores en Internet, y amenazan con matarlos. Los doce anunciantes del programa cancelan sus auspicios. Finalmente, *PD Notebook* pide disculpas y suspende la emisión del segundo informe.

Llega entonces el séptimo de caballería en la forma de otro e-mail, esta vez dirigido a un foro de Internet destinado a científicos, el *Biological Research Information Center*. El 5 de diciembre, el autor propone a sus colegas que revisen las fotos de líneas celulares del artículo de Hwang en busca de duplicaciones. El intercambio generado es tan intenso que llega a *Science* y es mencionado en la prensa coreana, de donde salta al periodismo internacional. El 12 de diciembre, la SNU anuncia el comienzo de su investigación. El 15 sale el segundo programa de *PD Notebook*, con la cámara oculta a Kim. Y el 16, Hwang y Schatten comunican a *Science* que quieren “retirar” su artículo, reconociendo sus fallas.

Finalmente, la investigación del fraude a cargo de la SNU dejó en claro que Hwang y su equipo no habían logrado ni una sola línea de células madres, es decir, rechaza los resultados de los

dos artículos publicados en *Science*. Sí reconoce un logro no trivial: que lograron obtener embriones por clonación, y que estos llegaron hasta la etapa de blastocisto, con una tasa de éxito del 10 por ciento de los intentos. Otro logro importante confirmado por el comité de la SNU es Snuppy, el perro afgano clonado, cuyo informe se publicó en *Nature* en 2005, y en el que Schatten también aparece como coautor.

Con respecto a la obtención de los ovocitos, los hallazgos de la investigación de la SNU fueron muy preocupantes: en lugar de los 427 informados, se demostró que el equipo de Hwang había usado 2.221, provenientes de 119 donantes, 66 de las cuales recibieron una compensación económica. Hwang no pudo alegar desconocimiento con respecto a la presión sobre sus jóvenes colaboradoras: una de ellas fue literalmente llevada de la mano a la clínica MizMedi por él. Y dos meses más tarde, colaboradores del equipo pidieron a las técnicas del laboratorio que firmaran un formulario ofreciéndose como donantes. Por otra parte, los efectos adversos documentados fueron importantes: de las 79 mujeres reclutadas en la clínica MizMedi, 15 debieron recibir tratamiento por el síndrome de hiperestimulación ovárica —relacionado con la administración de hormonas para inducir hiperovulación, y que puede causar desde náuseas hasta daño hepático y renal, o aun llevar a la muerte. De hecho, dos donantes debieron ser hospitalizadas [15].

La nueva financiación de la ciencia

¿Cómo se hace ciencia en la actualidad? La imagen del científico solitario, encerrado en su laboratorio haciéndose preguntas y tratando de responderlas para el bien de sus semejantes, utilizando recursos provenientes de fondos públicos, ya no corresponde a la realidad. Dos elementos cambiaron sustancialmente la escena. El primero es el ingreso masivo de fondos privados a la investigación en institutos y universidades. El segundo es la entrada de la ciencia en la bolsa. Los dos son consecuencia de la preocupación del gobierno norteamericano, a mediados de los setenta, por la caída de la productividad y de la competitividad de sus empresas en el mercado global, atribuida a la falta de innovación. El problema, como escribió Paul Gray del Instituto Tecnológico de Massachussets, era la falta de transferencia. La administración de Jimmy Carter puso en marcha la maquinaria legislativa, que comenzaría a funcionar durante el gobierno de Ronald Reagan. En 1980 se sancionó la *Stevenson-Wydler Technology Transfer Act*, pensada para facilitar la cooperación entre laboratorios públicos, universidades y grandes y pequeñas empresas. Ese mismo año, la *Bayh-Dole Act*, una enmienda a las leyes de patentes, otorgó a las universidades y centros de investigación la posibilidad de percibir derechos de propiedad intelectual por trabajos realizados con fondos públicos. Una tercera medida fundamental fue permitir, en 1986, que los científicos pudieran formar acuerdos cooperativos con empresas para comercializar descubrimientos realizados con fondos públicos.

Las patentes en poder de universidades crecieron significativamente, ya que la legislación sobre propiedad intelectual acompañó estos cambios: en 1980 la Corte Suprema de los Estados Unidos otorgó la primera patente sobre un organismo vivo, una bacteria modificada

genéticamente para degradar petróleo. Prácticamente todo producto biológico acabó pudiendo ser patentado: desde un gen a un ratón. Era el inicio de la industria biotecnológica. Y de la presión internacional para que todos los países pagaran *royalties*. Como explica el investigador en temas de ciencia y sociedad Sheldon Krinsky: “Las patentes y la protección a la propiedad intelectual se convirtieron en la solución elegida para proteger la posición competitiva de los Estados Unidos en una economía global.” En este contexto, los científicos de todo el mundo se vieron sometidos a un nuevo mandato: además de buscar y difundir nuevos conocimientos — su tarea tradicional— ahora debían también ser capaces de “usar ese conocimiento para el desarrollo de productos comercializables”, como describe Krinsky.

Esta nueva obligación, sin embargo, no llegaba sin recompensa: los principales accionistas de las nuevas empresas biotecnológicas eran los propios descubridores. Herbert Boyer, creador de la técnica Cohen-Boyer de ADN recombinante —un procedimiento para transferir genes de un organismo a otro, recurso fundamental de la industria biotecnológica— fue el fundador de la empresa Genentech en 1976 —que luego sería comprada en gran parte por la multinacional Roche, un destino común para las *start-ups* exitosas. Como accionista de Genentech, en apenas cinco años las acciones en poder de Boyer valían 40 millones de dólares, mientras que su salario en la University of California era de 50.000 dólares [16].

Un ejemplo más reciente y más impresionante: la empresa Celera, fundada por el científico norteamericano Craig Venter para secuenciar el genoma humano privadamente. Su creación fue la “tormenta perfecta”, según el consejero en inversiones Tom Jacobs. Cuando quedó claro que el método de secuenciamiento desarrollado por Venter era mucho más veloz que el que estaba usando el proyecto público y que Celera podría quedarse con patentes sobre gran parte del genoma humano, las acciones subieron de 7,34 dólares en junio de 1999 a 247 dólares el 6 de marzo de 2000: 35 veces en 9 meses.

Después llegó el anuncio conjunto de los dos proyectos —que hicieron Bill Clinton y Tony Blair en 2000— y la burbuja se desinfló: en junio de 2005 las acciones de Celera costaban 10 dólares. La empresa acumuló capital para trabajar durante cinco años, aunque muchos inversores quedaron en el camino [17]. Y ya comentamos el impacto del artículo de 2005 de Hwang en la bolsa coreana.

Estos nuevos horizontes de financiamiento, en apariencia ilimitados, representan posibilidades y riesgos para la ciencia. Por supuesto, amplían significativamente los recursos disponibles. Pero, por otro lado, han introducido valores, procedimientos e intereses muy diferentes. Si el mandato tradicional ha sido siempre, para los investigadores “publicar o perecer”, las patentes introducen el secreto: los resultados de las investigaciones con posible valor comercial no son publicados hasta ser protegidos por patentes: ¿dónde está el “comunitarismo” de la ciencia, del que hablaba el sociólogo Robert Merton? [18] Por otra parte, surge el problema de los conflictos de interés. Hay abundante bibliografía que muestra que la financiación privada distorsiona los resultados, introduciendo un sistemático *bias* [19]. Un caso dramático ha sido el de Jesse Gelsinger, quien murió durante un ensayo clínico de terapia génica. Las autoridades norteamericanas comprobaron que durante el ensayo se había violado el protocolo de

investigación varias veces. De manera notable, se advirtió tardíamente que el director del estudio era fundador de la empresa que tenía las patentes del tratamiento que se estaba probando.

En este sentido, no es casual que la *General Accounting Office* (GAO) de los Estados Unidos —una suerte de oficina de auditoría general, que reporta al Congreso de ese país— haya presentado en 2001 un informe sobre conflicto de interés, cambiando sustancialmente el eje de su preocupación con respecto a la aplicación de la *Bayh-Dole Act*. En efecto, los informes previos del GAO de 1991 y 1998 tenían que ver con si la enmienda cumplía el propósito de promover la transferencia, revisando las políticas en relación con el patentamiento de invenciones del gobierno y de las universidades. En 2001, en cambio, el foco del trabajo fueron los conflictos de interés; en el informe se revisaba cómo manejaban este problema las universidades e institutos de investigación que recibían fondos federales, a través del *Department of Health and Human Services* (HHS) [20]. La discusión persiste, porque no se ha logrado armonizar una política en ese país, y mucho menos en la comunidad científica internacional. En este sentido, la investigación con células madre embrionarias es una parte muy pequeña de un complejo panorama que, puede decirse, involucra a prácticamente toda la investigación en ciencias biomédicas.

La respuesta al escándalo

“En nuestra opinión, es muy importante que la respuesta al escándalo Hwang no incluya la imposición de regulaciones gubernamentales sin criterio, legislación draconiana, o criminalización. [21]” Estas palabras, escritas por Snyder a pocas semanas de la explosión del caso Hwang en el *NEJM*, parecen muy ponderadas. Sin embargo, como comentamos, Snyder planeaba asociarse a Hwang, de manera que su comentario, como otros que se oyeron tempranamente, no es del todo desinteresado.

Afortunadamente, hubo análisis del caso más equilibrados. Nos interesaría comentar dos. Uno de ellos, a cargo de los expertos en bioética Mildred K. Cho, Glenn McGee y David Magnus, fue publicado en la propia *Science*; el otro, orientado hacia el área de los estudios sociales de la ciencia, fue realizado por David B. Resnik, Adil E. Shammo y Krinsky, y publicado en el *journal Accountability in Research* [22]. Ambos tocan un abanico de cuestiones.

Cho *et al.* apuntan a aspectos específicos del sistema científico en Corea, como una regulación ética insuficiente en el momento en que se realizó la investigación y un bajo conocimiento de los investigadores de ese país de cuestiones básicas de esta área, como la Declaración de Helsinki; también critican la concentración de financiamiento y expectativas en un solo grupo. Pero señalan asimismo aspectos delicados de la regulación norteamericana. En este sentido, destacan la paradoja de que medidas tomadas para proteger la privacidad de los donantes, como el anonimato de la donación, pueden limitar la capacidad de investigar fallas éticas. Si ese hubiera sido el caso en el escándalo Hwang, se hubiera dificultado enormemente o hubiera sido imposible saber de dónde provinieron los ovocitos. Este anonimato también protege a los

inescrupulosos, porque interrumpe la circulación de la información entre los involucrados en la investigación.

Resnik *et al.*, en tanto, señalan cuatro puntos. En primer lugar, destacan la necesidad de que se busque una estandarización internacional de los criterios de la llamada “conducta responsable en investigación” —“responsible conduct of research”, o RCR. En este sentido, mencionan la importancia de la Declaración de Helsinki, así como las propuestas del *Council for the International Organization of Medical Sciences* (CIOMS), publicadas en 2002. En segundo lugar, recomiendan que se eduque a los investigadores en la RCR, como sugirió en Estados Unidos la *Office for Research Integrity* (ORI) en 2000. En tercer lugar, se refieren al sistema de revisión por pares, que analizaremos enseguida. En cuarto lugar, recomiendan que universidades y centros de investigación implementen medidas para auditar la información durante la investigación, tanto en laboratorios con antecedentes de problemas, como al azar. Reconocen que esto tendría un costo extra, pero creen que es tolerable y que resultaría en un reaseguro del sistema.

Finalmente, ambos trabajos señalan la necesidad de revisar el sistema de revisión por pares, en particular tal como lo implementa *Science*, una de las publicaciones más reticentes a incorporar normativa específica para detectar los conflictos de interés. Si bien ambos trabajos consideran que el sistema de revisión por pares no fue hecho para detectar fraudes, pues se basa en la confianza, Cho *et al.* sugieren la necesidad de una revisión del modo de atribuir responsabilidad a los diferentes autores, tanto adoptando las normas del *Internacional Committee of Medical Journal Editors*, como la noción de “contributor” propuesta por Rennie *et al.*[23] Resnik *et al.* insisten en la necesidad de un escrutinio más cuidadoso de las imágenes y fotografías, que en el caso Hwang hubiera permitido detectar el engaño. En esos dos aspectos, ya hay publicaciones que llevan la delantera.

El propio comité convocado por *Science* para revisar sus políticas de publicación coincide en señalar estos problemas, aunque no hace sugerencias sobre cómo resolverlos. Aclaremos que el comité estuvo conformado mayoritariamente por personas cercanas a *Science*, como tres miembros de su *Senior Editorial Board*, un ex editor de la revista que es actualmente *Executive Editor* en *Nature*, y dos biólogos que trabajan en células madre. Además de las observaciones ya comentadas, hay dos puntos del informe del comité, hecho público como “supporting online material” de la edición del 1 de diciembre de 2006 de *Science*, que merecen especial consideración. El primero es la afirmación de que actualmente *Science* recibe “un pequeño número de artículos que son o bien deliberadamente engañosos” —es decir, fraudulentos— o “sustancialmente distorsionados por el interés propio”. De manera significativa, el comité evita utilizar la frase “conflict of interest” —clásica en la bibliografía— y apela a una expresión más vaga como “self interest”, que parece cargar la responsabilidad más en las personas y menos en las instituciones. Es ciertamente una forma mitigada de hablar de los problemas derivados de la financiación privada de la ciencia y las cuestiones de propiedad intelectual. Otro aspecto interesante es que el comité destaca el valor excepcional de una publicación en *Science*, a la que compara explícitamente sólo con *Nature*:

Science (y *Nature*) han alcanzado un status especial. Publicar en *Science* tiene una significación que más allá de la de una publicación 'normal'. Consecuentemente, el valor para algunos autores de publicar en *Science*, incluyendo una mejora en su reputación, visibilidad, posición o mayores ganancias económicas es suficientemente alto como para que algunos no adhieran a los estándares científicos en su afán por lograr esa publicación.

Por eso, en sus recomendaciones, el comité sostiene que las medidas que adopte *Science* deben estar en armonía con las que adopte *Nature* y "otros pocos *journals* de alto perfil", para evitar que los autores busquen la publicación menos exigente [24]. En su editorial del 1 de diciembre de 2006, *Science* comenta estos aspectos e invita a sus lectores a participar de la discusión sobre qué medidas tomar [25].

Aunque insuficientes —dado que no señalan con el debido énfasis el problema del *bias* generado por los conflictos de interés y el complejo entramado económico-financiero que acompañó al caso Hwang, y que no es privativo de éste, como comentamos— la respuesta de *Science* parece, por lo menos, digna. Y ya vimos que fue drástica la respuesta de la SNU, que realizó una investigación profunda del caso y despidió a Hwang.

Lamentablemente, no fue así la respuesta de la *University of Pittsburg* en su revisión de la intervención de Schatten. Algunos aspectos del informe realizado por un panel de la universidad resultan sorprendentes. En primer lugar, el uso de un eufemismo para referirse a la conducta de Schatten: no se trató de "misconduct", sino de "misbehavior". Imposible intentar una traducción de este galimatías, pergeñado para salvar al acusado de un delito tipificado y que hubiera implicado un baldón en su carrera. Lo cierto es que la investigación del panel demostró que Schatten recibió 40.000 dólares de Hwang; que su participación en el artículo de la clonación del perro afgano se limitó a sugerir la contratación de un fotógrafo profesional; y que su participación en el artículo de clonación humana de 2005 fue simplemente un trabajo de reescritura. Está claro que no debería haber firmado el primer artículo, y hay investigadores que sostienen que tampoco debería haber firmado el segundo. El informe también deja en evidencia que Schatten mintió en cuanto a su intervención en las investigaciones, atribuyéndose un mayor protagonismo en primer lugar, y separándose del caso luego que se desató el escándalo [26]. Por otra parte, Schatten fue acusado en Corea de intentar patentar los hallazgos de Hwang [27].

Por su parte, Cibelli también fue investigado por su colaboración con Hwang. Aparentemente, su participación en el artículo de 2004 tuvo que ver con detalles técnicos que compartió con el equipo de Hwang. Sigue en la *Michigan State University* y, según declaró al diario *La Nación*, preocupado por la baja eficiencia en la obtención de células madre embrionarias —es decir por la cantidad de ovocitos necesarios para las técnicas actuales— se ha volcado a trabajar con células madre adultas. En este sentido, sostiene que "habría que pedir una moratoria a la clonación terapéutica" [28].

Ética y ganancias

Otro aspecto sobre el que merece reflexionarse a partir del caso Hwag tiene que ver con las cuestiones éticas involucradas en la donación de ovocitos. Como, en general, en la donación de cualquier órgano o tejido humano, se trata de un tema complejo, que excede el alcance de este trabajo. Sin embargo, nos gustaría comentar algunos aspectos. En relación con la donación de ovocitos, todavía no se conocen con suficiente certeza los riesgos derivados de los procedimientos necesarios para obtenerlos. Los protocolos para estimular la maduración de varios folículos requieren inyecciones subcutáneas diarias por entre una semana y diez días. Los ovocitos maduros se recogen por vía vaginal, en un procedimiento quirúrgico que requiere anestesia. El comité de ética de la *American Society for Reproductive Medicine* sostiene que las mujeres que se someten a estos protocolos pasan unas 56 horas en procedimientos médicos, contando desde entrevistas informativas hasta la cirugía y los controles finales [29]. Además de incómodos, estos procedimientos implican riesgos. Como concluyeron investigadores en un reciente encuentro promovido por el CIRM y en cuya organización participó el Institute of Medicine de los Estados Unidos, además del síndrome de hiperestimulación ovárica, sobre el que existen estimaciones muy preliminares acerca del porcentaje de mujeres que podrían sufrirlo, tampoco hay evidencias concluyentes acerca de si esta estimulación puede afectar el riesgo de cáncer de útero. Sí se conoce con más certeza que la hiperestimulación aparentemente no aumenta el riesgo de cáncer de mama o de ovario invasivo [30].

Con estos riesgos en mente, se presenta la duda acerca del delicado tema de la retribución económica. La tendencia es a no retribuir la donación, o a hacerlo de modo módico. Por ejemplo, en California, debido al impulso por la creación del CIRM a partir de la Proposición 71, acaba de aprobarse una ley que regula la obtención de ovocitos, la que fue celebrada por grupos que siguen de cerca estas cuestiones, como el *Center for Genetics and Society*. La nueva ley, confirmada por el gobernador republicano Arnold Schwarzenegger el 26 de septiembre de 2006, da a las donantes el estatus de “sujetos de investigación”, lo que pone en aplicación de manera automática regulaciones de alcance nacional y estatal que las protegen. Entre otros aspectos, este estatus implica la obligatoriedad de la obtención del consentimiento informado, la atención médica obligatoria en caso de efectos adversos, y declaración de conflictos de interés de los científicos involucrados. También establece un límite sobre cuánto puede pagarse a las donantes, tendiendo en cuenta recomendaciones de la National Academies of Sciences, que en un reciente informe recomendó pagar sólo por los gastos involucrados en la donación. Evidentemente, se pone el énfasis en el carácter “altruista” de la donación. Esta ley se aplicaría a toda la investigación realizada en el estado, así como a toda la financiada por el CIRM, independientemente de dónde se procuren los ovocitos. De manera muy interesante, la *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM), que reúne a los profesionales de la fertilización asistida en ese estado —donde se comprobó el tráfico de

ovocitos en un centro de fertilización asistida de la University of California en Irvine, que comentamos en *Química Viva*— hizo lobby para quedar fuera de su alcance [31].

En relación con el altruismo, el límite a la retribución económica parece razonable, por estar la donación involucrada con cuestiones de salud y enfermedad, y para poner lo donado fuera del mercado, no adjudicándole valor económico sino, si se quiere, psicológico, simbólico o espiritual. En una línea de razonamiento próxima, muchos expertos consideran —y parece casi de sentido común— que dar una retribución puede exponer a poblaciones vulnerables a convertirse en donantes no voluntarios sino compulsivos, al ser empujados por su necesidad de dinero. Sin embargo, como insisten Magnus y Cho, las donantes no son simples sujetos de investigación, dado que no se van a beneficiar de manera directa con el tratamiento [32]. En este sentido, surge una pregunta inevitable: si estas donaciones van a ser usadas en investigación que puede concluir en el desarrollo de un producto patentado, que va a dar ganancias a varios actores intermedios para concluir enriqueciendo probablemente a alguna gran compañía farmacéutica, ¿cómo justificar que las donantes no participen de esas ganancias? Sobre todo, considerando que las materias primas que aportaron fueron imprescindibles para el desarrollo, y para nada triviales las molestias y riesgos a los que se expusieron.

Podría argumentarse que se trata de salvar vidas. En ese sentido, todos los actores involucrados podrían comprometerse a participar del esfuerzo solidariamente, por el bien común. ¿También las compañías propietarias de la patente? Solo para dar un ejemplo, se estuvo discutiendo recientemente en los Estados Unidos una droga biotecnológica desarrollada por la compañía Genentech —propiedad mayoritaria de Roche—, cuyo nombre comercial es Avastatin, y que se introdujo para tratar el cáncer de colon y ahora se usaría también para tratar el de mama y pulmón. En estas nuevas indicaciones, el precio tratamiento podría ascender a 100.000 dólares. Y no se trata de drogas para grupos minoritarios, “orphan drugs”: el mercado estimado para Avastatin es de cientos de miles de pacientes. Por lo cual sus ganancias estimadas para 2009 podrían ascender a 7.000 millones de dólares. ¿Fue tan caro desarrollarla? ¿Genentech está en problemas financieros? Para nada, sus ganancias son excelentes. ¿Qué argumentan los ejecutivos de la empresa? Como comenta el periodista de *NYT* Alex Berenson, ya han superado la etapa de decir “hay que pagar el precio de la innovación”. Ahora usan como argumento lo que Berenson llama “el valor inherente de las terapias para la vida”. Y el periodista cita a William M. Burns, que involucra en su comparación a otra droga, la Herceptina, cuyo tratamiento cuesta 40.000 dólares anuales en los Estados Unidos: “Cuando observamos los precios de Avastatin y Herceptina, en este momento la economía de la salud se sostiene, y por ese motivo no hay razón para tocarlos”. Y más adelante cita indirectamente al mercado: “La presión de la sociedad para usar productos fuertes y buenos está allí.” En consecuencia, muchos pacientes, aun en un país rico como los Estados Unidos, no pueden acceder a esta droga. Como comenta en el mismo artículo David Johnson, jefe de la unidad de cáncer en la Vanderbilt University y ex presidente de la *American Society of Clinical Oncology*, “Avastatin es una droga excelente, pero su costo hace que

algunos pacientes y médicos eviten usarla.” Más explícitamente, sostiene, “Ojalá costara una décima parte; si ese fuera el caso, se la daría a casi todo los pacientes. [33]”

En el mismo sentido, se está discutiendo en California de qué manera reconocer la inversión de ese estado para sostener, a través de la Proposición 71, el CIRM. ¿Tendrían sus residentes acceso a menor precio a las drogas y tratamientos desarrollados a partir de la investigación financiada por ese instituto? Eso es lo que está reclamando el CIRM en un debate de bajo perfil que se está realizando ahora mismo. Las empresas se resisten, argumentando que esa concesión resultaría redundante con otras disposiciones que regulan el acceso a los medicamentos, de alcance federal y estatal en los Estados Unidos. Estamos hablando de una inversión de 3.000 millones de dólares, hecha con dinero de los contribuyentes [34].

El presente y el futuro

A pesar de los temores de Snyder y de otros en el campo, la investigación en células madre embrionarias no se detuvo tras el escándalo que desató el caso Hwang, tal como previó tempranamente una mesa de expertos convocados en la última reunión anual de la *American Association for the Advancement of Science* (AAAS) [35]. En el mundo, son varios los grupos trabajando activamente en esta línea, en países como los Estados Unidos, el Reino Unido, España y China, además de Corea [36].

De hecho, el impulso a la biotecnología en Corea continúa, y de manera entusiasta. A partir de noviembre de 2006, comenzaron a celebrarse simposios para discutir proyectos en células madre, haciendo uso de 450 millones de dólares que el gobierno coreano prometió para financiar este campo durante 10 años —de los cuales, el 30 por ciento se destinará, precisamente, a la investigación con células madre embrionarias. La mayor parte de la financiación en este sentido se la llevará el Stem Cell Research Center, de Seúl, que tendrá 15 millones anuales hasta 2012. Y hay otra iniciativa, del Ministerio de Ciencia, que aportará 4,5 millones de dólares anuales [37].

Hwang está nuevamente trabajando en investigación, aunque no con células madre embrionarias, y con financiamiento privado. En julio de 2006, mientras esperaba que comenzara su juicio por defraudación en el manejo de fondos públicos —en el que alegó que desvió fondos para comprar muestras de mamuts, para intentar clonar esta especie, a la mafia rusa— Hwang abrió un laboratorio en Guro, junto a otros 20 investigadores. El laboratorio es parte del *Suam Bioengineering Research Institute*, y recibe 2,6 millones de dólares anuales de la *Suam Scholarship Foundation* para trabajar en clonación y células madre de animales, producción de órganos animales para transplantes, y productos biológicos textiles [38].

El campo tampoco parece poder librarse de los escándalos. El último, muy reciente, se desató a partir de la publicación en agosto de 2006 de una nueva técnica para obtener células madre embrionarias que se promocionó como “políticamente correcta”. Hasta ahora, la única alternativa para obtener estas células era tomarlas del interior del embrión en la etapa de blastocisto —lo que implica la destrucción del embrión y desata el rechazo de diversos sectores, entre ellos del propio presidente Bush. La propuesta de Robert Lanza, de *Advanced*

Cell Technologies —coautor con Cibelli del primer artículo de clonación humana en 2001— implica tomar una célula del embrión en la etapa de 8 células, la que aparentemente sería viable en cultivo, sin afectar el futuro del embrión. Este procedimiento se utiliza para el diagnóstico genético preimplantatorio en la fertilización asistida. En un *podcast*, Lanza dijo que habían logrado “obtener células madre embrionarias sin destruir el embrión”. Sin embargo, tal como sostenían los autores en el artículo en *Nature* donde comunicaban su trabajo, los 16 embriones donados que utilizaron fueron destruidos durante el experimento. Obtuvieron un total de 91 blastómeros, de donde derivaron dos líneas de células madre. Lo que permite especular con que estas biopsias *podrían* dar origen a líneas celulares sin afectar el desarrollo normal del embrión —algo posible pero que todavía no se ha logrado. Lanza declaró desafiante al NYT, poco antes de las elecciones de octubre: “No queda una razón racional para oponerse a esta investigación”. Pero fue desmentido por una vocera de la Casa Blanca, argumentando que las preocupaciones éticas de Bush tienen que ver con la investigación en embriones en términos generales. El caso fue tan escandaloso que un senador republicano que aprueba la investigación con células madre —una rareza— reprendió en público a Lanza: “Es un verdadero problema si los científicos hacen declaraciones falsas y poco rigurosas”, dijo Arlen Specter [39].

¿Qué enseñanzas quedan para los países en desarrollo? En primer lugar, puede ser interesante observar en este caso la dinámica de la colaboración entre investigadores de países centrales y periféricos. En un artículo previo, comentamos algunas de las peculiaridades del trabajo en nuestro país, entre ellas, el hecho de que, para tener acceso a instrumental avanzado o facilitar la publicación en *journals* internacionales, ocurre a veces que los investigadores “inviten” a colegas de países centrales, ofreciéndoles compartir el crédito por trabajos en los que tuvieron poca participación [40]. Parece evidente, como destacaron algunos observadores, que la inclusión, primero de Cibelli en el artículo de 2004 y sobre todo de Schatten en el artículo de 2005, pudo haber sido una estrategia para facilitar la publicación en *Science*, un *journal* de excepcional alto perfil, como reconoció el comité convocado por la propia publicación.

Otro aspecto crucial es que Schatten sólo se separó de Hwang cuando surgieron evidencias de fraude: parecen no haberle preocupado las posibles fallas éticas denunciadas por *Nature* en 2004. De hecho, Schatten años antes había utilizado óvulos y embriones provenientes del infausto caso del centro de fertilización asistida de la University of California en Irvine, caso del que salió indemne porque aparentemente se probó que no conocía el origen dudoso de esos materiales [41]. Queda claro que las colaboraciones internacionales no sólo no protegen de los lapsus éticos, sino que incluso podrían aumentar la probabilidad de que ocurran. En el caso de Hwang, fueron varios los investigadores que hablaron del “entusiasmo” de los coreanos por la medicina regenerativa para justificar la facilidad con que su equipo conseguía los ovocitos, dejando en segundo plano denunciar la regulación débil [42]. De manera que sólo una regulación y control estrictos en los propios países periféricos podría asegurar la protección de los derechos de sus ciudadanos.

En este sentido, es importante el papel de contralor que jugaron los medios en el caso. En su país, Hwang contaba con el apoyo de la comunidad científica, del sistema político, del sistema económico y hasta de la opinión pública. Todo esto, respaldado por el reconocimiento de la comunidad científica internacional. Está claro que en tiempos de comercialización de la ciencia, el periodismo debe ser muy cuidadoso con respecto a los conflictos de interés en que puede verse involucrado —como comentamos en un artículo previo— para poder funcionar como fiscal en el momento necesario [43].

Finalmente, es importante tener en cuenta que no hay, para los países periféricos, un modo fácil de escapar de la problemática del patentamiento y los crecientes costos médicos. Un reciente informe muestra que la medicina regenerativa puede ser un recurso de salud pública fundamental también en los países pobres. En el mismo trabajo se contrasta el costo de una vacuna de ADN recombinante para hepatitis B desarrollada por la empresa india Shantha Biotechnics —apenas 40 centavos de dólar por dosis— con el costo de las vacunas importadas, que oscila entre 8 y 10 dólares por dosis [44]. Los nuevos desarrollos no van a ser accesibles en los países periféricos si vienen desde afuera, lo que confirma la importancia de impulsar la investigación biotecnológica local.

Referencias

- [1] “Ethics and fraud” (2006), editorial I, *Nature*, vol. 439, No. 7073, 12 de enero, pp. 117
- [2] Woo Suk Hwang *et al.* (2004), “Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst”, *Science*, Vol. 303, 12 de marzo, pp. 1769-1674.
- [3] Cibelli, Jose B. (2001), “Somatic cell nuclear transfer in humans: pronuclear and early embryonic development”, rapid communication, e-biomed *The Journal of Regenerative Medicine*, Vol. 2, 26 de noviembre.
- [4] Número especial: La clonación humana, *Química Viva*, Vol. 3, No. 1, abril. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Foro%20clonado/foro%20clonado.html>.
- [5] Kolata, Gina (2004), “Cloning creates human embryos”, *The New York Times*, 12 de febrero. Disponible en: <http://www.nytimes.com/2004/02/12/science/12CELL.html?ex=1077609534&ei=1&en=8169dc53ce9f2439>
- [6] Cyranoski, David (2004), “Stem-cell research: Crunch time for Korea’s cloners”, *Nature*, Vol. 429, 6 de mayo, pp. 12-14.
- [7] “Ethics of therapeutic cloning” (2004), *Nature*, Vol. 429, 6 de mayo, p. 1.
- [8] “Reactions to the Hwang scandal” (2006), *Science*, Vol. 311, p. 606.
- [9] Woo Suk Hwang *et al.* (2005), “Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocyst”, *Science*, Vol. 308, 17 de junio, pp. 1777-1783.

- [10] "An offshore haven for human embryonic stem-cell research?" (2005), *New England Journal of Medicine*, Vol. 353, No. 16, 20 de octubre, pp. 1645-1649.
- [11] Gottweiss, Herbert y Robert Triendl (2006), "South Korean policy failure and the Hwang debacle", *Nature Biotechnology*, Vol. 24, febrero, pp. 141-143.
- [12] Pollack, Andrew (2005), "California stem-cell program is hobbled but staying the course", *New York Times*, 10 de diciembre. Disponible en: <http://www.nytimes.com/2005/12/10/business/10stem.html?ex=1138942800&en=3e2333f4798d64d5&ei=5070>.
- [13] Russo, E. (2005), "Follow the money - The politics of embryonic stem cell research", *PLoS Biology*, Vol. 3, No. 7, 5 de julio, pp. 1168-1171.
- [14] Chong, Sei y Dennis Normile (2006), "How young Korean researchers helped unearth a scandal...", *Science*, Vol. 311, 6 de enero, pp. 22-23-25.
- [15] Normile, Dennis, Gretchen Vogel y Jennifer Couzin (2006), "South Korean team remaining stem cell claim demolished", *Science*, Vol. 311, 13 de enero, pp. 156-157; Chong, Sei (2006), "Investigations document still more problems for stem cell researchers", *Science*, Vol. 311, 10 de febrero, pp. 754-755.
- [16] Krinsky, Sheldon (1999), "The profit of scientific discovery and its normative implications", *Chicago Kent Law Review*, Vol. 75, No. 3, pp. 15-39.
- [17] Jacob, Tom (2005), "Beware the biotech barker", *Nature Biotechnology*, Vol. 23, No. 5, mayo, p. 538.
- [18] Merton, Robert (1964) [1949], *Teoría y estructuras sociales*, México, Fondo de Cultura Económica, pp. 544-552.
- [19] Para un review de la literatura sobre conflictos de interés, ver: Vara, Ana María (en prensa), "Periodismo científico: ¿preparado para enfrentar los conflictos de interés?", *Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad*.
- [20] GAO (1991), *Technology Transfer: Federal Agencies' Patent Licensing Activities* (GAO/RCED-91-80), Washington, DC, General Accounting Office; GAO (1998), *Technology Transfer: Administration of the Bay-Dole Act by Research Universities* (GAO/RCED-98-126), Washington, DC, General Accounting Office; GAO (2001), *Biomedical Research: HHS Direction Needed to Address Financial Conflicts of Interest* (GAO/RCED-02-89), Washington, DC, General Accounting Office.
- [21] Snyder, Evan Y. y Jeanne F. Loring (2006), "Beyond fraud – Stem research continues", *New England Journal of Medicine*, Vol. 354, No. 4, 26 de enero, pp. 321-324, en p. 323.
- [22] Cho, Mildred K., Glenn McGee y David Magnus (2006), "Lessons of the stem cell scandal", *Science*, Vol. 311, 3 de febrero, pp. 614-615; Resnik, David B., Adil E. Shammo y Sheldon Krinsky (2006), "Fraudulent human embryonic stem cell research in South Korea: lessons learned", *Accountability in Research*, 13, pp. 101-109.
- [23] International Committee of Medical Journal Editors (2005), "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals". Disponible en: <http://www.ICMJE.org>; Rennie,

D., V. Yank y L. Emmanuel (1997), *Journal of the American Medical Association*, Vol. 278, p. 597.

[24] Brauman, John, John Gearhart, Douglas Melton, Linda Miller, Linda Partridge y George Whitesides (2006), "Committee Report – Hwang *et al.*, *Science*, 308, 1777-1783 (2005)", Supporting Online Material. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/314/5804/1353/DCI>.

[25] Kennedy, Donald (2006), "Responding to fraud", *Science*, Vol. 308, 1 de diciembre, p.1353.

[26] Holden, Constance (2006), "Schatten: Pitt panel finds 'misbehavior' but not misconduct", *Science*, Vol. 311, 17 de febrero, p. 928.

[27] Kim, Tae-gyu (2006), " 'Schatten stole Hwang's patent' ", *The Korea Times*, 8 de enero. Disponible en: <http://times.hankooki.com>.

[28] Bär, Nora (2006), "Habría que pedir una moratoria de la investigación en clonación terapéutica", *La Nación*, 30 de octubre. Disponible en: <http://www.lanacion.com.ar/853986>.

[29] Steinbrook, Robert (2006), "Egg donation and human embryonic stem cell research", *New England Journal of Medicine*, Vol. 354, No. 4, 26 de enero, pp. 323-326.

[30] Kleffman, Sandra (2006), "Egg donors may face unknown pitfalls, stem cell researchers say", *Contra Costa Time*, 28 de septiembre. Disponible en: http://www.mercurynews.com/mld/mercurynews/news/breaking_news/15634713.htm.

[31] Vara, Ana María (2004), "Un recurso escaso y la desigualdad entre los sexos", *Química Viva*, Vol. 3, No. 1, abril. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Foro%20clonado/anavara.html> ; CGS (2006), "California victory: standards and safeguards on eggs for research", *Genetic Crossroads*, 20 de octubre. Disponible en: <http://www.genetics-and-society.org/newsletter/archive/20061020.html>; Romney, Lee (2006), "New battle lines are drawn over egg donation", *Los Angeles Times*, 13 de septiembre.

[32] Magnus, David y Mildred Cho (2005), "Issues in oocyte donation for stem cell research", *Science*, Vol. 308, pp. 1747-1748.

[33] Berenson, Alex (2006), "A cancer drug shows promise, at a price mane can't pay", *New York Times*, 15 de febrero. Disponible en: <http://www.nytimes.com/2006/02/15/business/15drug.html?ex=1297659600&en=bc6aaaf25acfa44&ei=5088>; Pritchard, Carolyn (2006), "Genentech earnings up 58%", *MarketWatch*, 10 de octubre. Disponible en: <http://www.marketwatch.com/news/story/Story.aspx?guid=%7B64F2583E-2D9F-496F-8AEB-B783DD84D8EF%7D&siteid=>

[34] Información sobre esta negociación puede encontrarse en el blog de David Jensen: <http://californiastemcellreport.blogspot.com/>

[35] Lempinen, Edward (2006), "Stem cell experts assess the impact of Hwang fraud on research, public trust". Disponible en: <http://www.aaas.org/news/releases/2006/021stemcell.shtml>.

- [36] Vogel, Gretchen (2006), "Picking up the pieces after Hwang", *Science*, Vol. 312, 28 de abril, pp. 51-517.
- [37] Normile, Dennis (2006), "South Korea picks up the pieces", *Science*, Vol. 312, 2 de junio, pp. 1298-99; "South Korea finds time and cash for stem cells" (2006), *Nature*, Vol. 444, 2 de noviembre, p. 15.
- [38] "A second chance" (2006), *Science*, Vol. 313, 1 de septiembre, p. 1233.
- [39] Klimanskaya, I, Y. Chung, S. Becker, S. J. Lu y R. Lanza (2006), "Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres", *Nature*, sólo en la web. Disponible en: <http://www.nature.com/nature/journal/vaop/ncurrent/abs/nature0514.html>; Wade, Nicholas (2006), "Stem cells could intensify political debate", *New York Times*, 26 de agosto. Disponible en: <http://www.nytimes.com/2006/08/24/science/24stem.html>; Okie, Susan (2006), "Single-cell storm", *New England Journal of Medicine*, 18 de octubre, pp. 1634-1635.
- [40] Vara, Ana María y Hurtado de Mendoza, Diego (2004), "Comunicación pública, historia de la ciencia y 'periferia' ", en AA.VV. (2004), *Certezas y controversias. Apuntes sobre la divulgación científica*, Buenos Aires, Libros del Rojas-Universidad de Buenos Aires, pp. 71-103.
- [41] Guterman, Lila (2006), "Silent scientist under fire: the American collaborator of a disgraced South Korean is keeping mum", *Chronicle of Higher Education*, 27 de enero. Disponible en: <http://chronicle.com/free/2006/01/2006012701n.htm>.
- [42] Wakayama, Teruhiko (2004), "On the road to therapeutic cloning", *Nature Biotechnology*, Vol. 22, No 4, pp. 399-400.
- [43] Vara, *op. cit.*, nota 19.
- [44] Greenwood, Heather L, Peter A. Singer, Gregory P. Downey, Douglas K. Martin, Halla Thorsteinsdottir, Abdallah S. Daar (2006), "Regenerative medicine and the developing world", *PLoS Medicine*, Vol. 3, No 9, septiembre, pp. 1496-1500.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 5, diciembre 2006

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

La regeneración del sistema nervioso central: Cambios de paradigma y medicina regenerativa

The regeneration of the central nervous system: changes of paradigm and regenerative medicine

Pablo Francisco Argibay

Unidad de Biología del Cerebro
Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental
Hospital Italiano de Buenos Aires

pablo.argibay@hospitalitaliano.org.ar

Recibido el 23/11/06. Aceptado el 30/11/06.

[Versión para imprimir](#) 

“En el cerebro adulto, las vías nerviosas son fijas e inmutables; todo puede morir, nada puede regenerarse.”

Santiago Ramón y Cajal, 1928

“El hombre que acoge un nuevo paradigma en una etapa temprana debe hacerlo a menudo desafiando la evidencia acumulada por la resolución de problemas. Esto es, debe tener fe en que el nuevo paradigma triunfará con los muchos grandes problemas a que se verá enfrentado, sabiendo solamente que el antiguo paradigma ha fallado con unos

pocos. Una decisión de este carácter solo puede hacerse sobre un acto de fe.”

Thomas Kuhn

Abstract

Contrary to the traditional view that neurogenesis in the adult brain ceases during prenatal development, it is now well established that the hippocampus and the subventricular zone continues to produce neurons in the adulthood in several species, including humans. Moreover, accumulating evidence from anatomical, electrophysiological and immunohistochemical studies indicates that the newly generated cells become integrated into the circuitry of the hippocampal system. There remains, however, considerable controversy over the functional significance of these new cells. On the other hand, investigation of the molecular and cellular events sustaining intrinsic brain-repair mechanisms and a better understanding of why they fail over time in chronic disorders might, therefore, provide an attractive working hypothesis within which to develop new and efficacious therapies for neurological diseases. The review here presented intends to describe the current knowledge regarding the process of neurogenesis, their mechanisms, and the potential role for newly generated neurons in terms of neuroplasticity and regenerative medicine.

Resumen

La visión tradicional de que la generación de nuevas neuronas (neurogénesis), cesa luego del desarrollo prenatal, está actualmente siendo modificada; se ha comprobado que al menos en dos regiones del cerebro, el hipocampo y la zona subventricular, se generan nuevas neuronas a lo largo de la vida. Esto se ha confirmado en diversas especies y aun en el ser humano. Por otra parte, se ha determinado que las nuevas neuronas se integran en el hipocampo en los circuitos preexistentes. Obviamente, es bastante dificultoso determinar el significado funcional de estas nuevas neuronas, a pesar de lo cual se considera que intervendrían en procesos fisiológicos relacionados a la esfera cognitiva, más precisamente asociados al almacenamiento y recuperación de la memoria reciente.

El mencionado cambio de paradigma, trae aparejado también un potencial rol terapéutico para la neurogénesis y una nueva interpretación a diversas enfermedades degenerativas del sistema nervioso central. La presente revisión del tema intenta describir el conocimiento actual del fenómeno de neurogénesis, los mecanismos involucrados y su potencial significado funcional en condiciones fisiológicas y de enfermedad.

1. Nuevas neuronas en el cerebro del adulto:

El paradigma de un sistema nervioso central incapaz de restituir las células neuronales que progresivamente se van perdiendo comenzó a ser puesto en duda a mediados de la década del 60. Sin embargo, los trabajos pioneros de la época no fueron tenidos en cuenta principalmente debido a cuestiones técnico-metodológicas (Altman J, 1965) (Kaplan MS, 1977).

Recién en la década del 80, el avance notorio de la inmunohistoquímica, la citología y las técnicas moleculares; cambiaron el paradigma dominante. Investigadores como Goldman y Nottebohm sugirieron que la generación de nuevas neuronas, la neurogénesis, podría ser un fenómeno normal en el cerebro de canarios adultos (Goldman SA, 1983), el mismo grupo demostró en un trabajo posterior que las nuevas neuronas se incorporaban a circuitos funcionales (Paton JA, 1984).

A principios de los años 90, Reynolds y Weiss lograron aislar en ratones, en una zona del cerebro, el cuerpo estriado, células con propiedades de células madre (Reynolds BA, 1992). En esa misma época, Lois y Alvarez-Buylla identificaron a la zona subventricular (SVZ) del ratón como sitio de localización de precursores neuronales (Lois C, 1993). Hacia fines de los años 90 se observó que la neurogénesis era un fenómeno extendido a los primates superiores incluido el ser humano. (Gould E, 1999). Utilizando bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, el grupo de Fred Gage muestra que en el cerebro del ser humano se observa neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, una zona de notable interés funcional por estar básicamente relacionada con la memoria y el aprendizaje (Eriksson PS, 1998)

Con el tiempo, diferentes experimentos mostraron que el destino de las nuevas células subgranulares hipocámpales era migrar hacia la zona granular, diferenciarse en neuronas y emitir conexiones funcionalmente activas con otras áreas del hipocampo, básicamente el área CA3 (Markakis EA, 1999) (van Praag H, 2002).

En relación a la neurogénesis en el hipocampo, diversos experimentos mostraron que ésta se encuentra incrementada por las condiciones ambientales y la ejecución de tareas motoras. Por ejemplo, en ratones, la exposición a un ambiente enriquecido es capaz de estimular la neurogénesis (Kempermann G, 1997). Por otro lado, se observó que el ejercicio físico puede producir dicho fenómeno (van Praag H, 1999). Incluso existe evidencia de que estímulos específicos son capaces de generar neurogénesis y cambios adaptativos en zonas relacionadas con esos estímulos. Un ambiente enriquecido con estímulos odoríferos genera un aumento en la producción y migración de neuronas hacia el bulbo olfatorio sin afectar la neurogénesis del hipocampo (Rochefort C, 2002). Por el contrario, un ambiente enriquecido inespecíficamente o la simple actividad física del correr en una rueda, estimula en ratones, la neurogénesis en el hipocampo, pero no la relacionada con áreas olfatorias (Brown J, 2003).

Finalmente la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto ha sido relacionada con diversas enfermedades. Gould y colaboradores mostraron que en la musaraña un animal arborícola relacionado por ambas partes con los primates y los insectívoros, el estrés psicosocial es un regulador negativo de la neurogénesis del hipocampo. (Gould E, 1997). El mismo grupo mostró que las experiencias estresantes en etapas tempranas del desarrollo inhibe la proliferación de precursores de células granulares del hipocampo en ratas (Tanapat P, 1998).

En el área de la psiquiatría, la relación entre la enfermedad depresión mayor y el estrés, así como las alteraciones del hipocampo propias de la enfermedad depresiva (Videbech P, 2004), han hecho pensar en una relación entre neurogénesis y esta enfermedad. Sin embargo, si bien en modelos animales de depresión parecería haber una reducción en la neurogénesis, las bases fisiopatológicas de la disminución de la neurogénesis como sustrato de la enfermedad depresiva es aun controversial (Kempermann G. 2002). No obstante lo anterior es clara la

relación entre terapias antidepresivas y estimulación de la neurogénesis. Incluso en un elegante modelo experimental, Santarelli y colaboradores parecieron demostrar la necesidad de una neurogénesis intacta para que sea efectiva la acción de algunas drogas antidepresivas (Santarelli L, 2003). Es interesante hacer notar que en este trabajo la sola inhibición de la neurogénesis por irradiación selectiva de las zonas de neurogénesis no produjo cambios conductuales en los animales. No obstante lo anterior, en trabajos previos se observó que una supresión selectiva de células recién nacidas afecta tareas relacionadas con el hipocampo (Shors TJ, 2001). En fin, como ha dicho alguna vez Elizabeth Gould, "Los antidepresivos probablemente hagan muchas cosas que no estén relacionadas directamente con su acción terapéutica". Si este es el caso de la clara estimulación de los antidepresivos sobre la neurogénesis, no lo sabemos a ciencia cierta y es tema de debate (Thomas RM, 2003). Es probable que como lo muestra el trabajo de Santarelli y colaboradores, la inhibición de la neurogénesis per se, no sea la principal causa de la enfermedad depresiva, aunque es necesaria la presencia de nuevas neuronas para la acción de algunos antidepresivos. Como quiera que sea, el concepto de neurogénesis como mecanismo de neuroadaptación a diferentes circunstancias conductuales y patológicas es interesante y merece ser analizado en el futuro con más detenimiento (Schaffer DV, 2004).

Está de más decir que gran parte de los estudios arriba mencionados, se han llevado a cabo en modelos animales. Y si bien está prácticamente probada la neurogénesis en los seres humanos y su correlación establecida post mortem con ciertas patologías, resta aun un largo camino por recorrer para establecer el significado funcional (si es que lo tiene), de la neurogénesis en el ser humano. Fundamentalmente el desarrollo de métodos por imágenes in vivo a nivel celular y molecular, podrán evidenciar dinámicamente la relación entre la generación de nuevas neuronas en el cerebro humano, su localización y su potencial rol funcional (Oweida AJ, 2004).

2. ¿Posee el organismo mecanismos fisiológicos de reparación cerebral?

Una hipótesis más que provocativa sugiere que las alteraciones crónicas inflamatorias y degenerativas, así como los déficit post isquemia del cerebro adulto, son más el resultado de un mecanismo defectuoso, inapropiado o no lo suficientemente eficaz, dada la magnitud de las agresiones relacionadas al organismo humano, de reparación que de la patogenicidad del insulto en sí (Martino G., 2004).

El accidente cerebro vascular (stroke) la esclerosis múltiple, las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, así como otras enfermedades degenerativas, tienen efectos crónicos e incapacitantes con un costo altísimo económico, individual y social. Por otra parte, las terapias disponibles actualmente, distan de ofrecer un tratamiento efectivo en estos enfermos. El fracaso del paradigma clínico convencional, ha hecho que se busquen hipótesis alternativas,

basadas obviamente en sólidos hechos clínicos y experimentales. En varios experimentos se ha observado que luego de diversas injurias, se producen cambios en la interacción entre los axones de la zona dañada y las células de la glía. Estos mecanismos prevendrían una muerte neuronal excesiva y la formación de cicatrices, a la vez que estimularían la remielinización y reformarían circuitos y sinapsis compensatorias (Monje M. et al. 2003) (Bereyre F. et al. 2004).

En el caso de una patología crónica y desmielinizante como la esclerosis múltiple se han observado episodios espontáneos de remielinización en particular en las etapas iniciales del problema. Estos mecanismos son finalmente superados por el avance de la enfermedad; lo que ha hecho más sustentable la hipótesis del “fracaso” de los mecanismos de autorreparación cerebral (Trapp B. et al. 1998) (Franklin R. 2002). Es interesante el hecho de que ante la injuria inflamatoria los linfocitos tienen una acción dual, ya que si bien generan una reacción inflamatoria, por otra parte producen factores neurotróficos que participan directamente en los procesos de neurogénesis, como BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor) y neurotrofinas. Incluso (Tumour necrosis factor), tienen citoquinas altamente tóxicas como el TNF efectos neurotróficos cuando actúan sobre receptores diferentes. (Arnett H. et al. 2001).

Por otra parte, se ha sugerido que a partir de las zonas cerebrales injuriadas se liberarían cascadas de quemoquinas quemoatrazoras que activarían la migración y diferenciación neuronal de células progenitoras adultas. (Klassen H. et al. 2003) .

3. Creando una nueva neurona en el cerebro adulto

La generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto de varias especies, incluido el ser humano es un tema totalmente aceptado. Independientemente de algunos resultados dispares como consecuencia de dos problemas fundamentales: la marcación con BrdU y sus limitaciones en términos de especificidad, además de la existencia discutible de marcadores exclusivamente neuronales. (Cooper-Kuhn CM, 2002) (Hayes NL, 2002) .

La neurogénesis del adulto, ha sido demostrada en el hipocampo y la zona subventricular (SVZ). Sin embargo, una evidencia reciente muestra que el cuerpo estriado y aun la neocorteza podrían ser sitios activos de neurogénesis (Dayer AG, 2005) .

Particularmente en el ser humano se ha puesto atención en la zona subgranular del hipocampo (SGZ), por las implicancias de esta región cerebral en procesos cognitivos diversos. Fotos 1 y 2. En el hipocampo, se han propuesto diversos modelos para explicar la proliferación celular en la SGZ hasta el establecimiento de nuevas conexiones por las neuronas maduras. (Kempermann G, 2004).

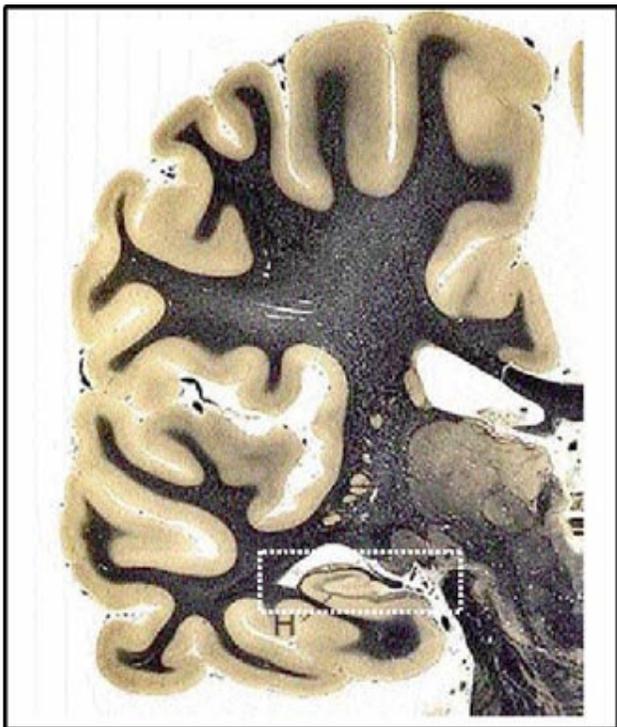


Foto 1

Foto 1: Corte frontal de un cerebro humano, donde se muestra la ubicación del hipocampo (H). (Tinción de Weigert: se observa teñida de negro la sustancia blanca). Gentileza del Dr. Gabriel Fraticola.

El desarrollo del sistema nervioso central termina en etapas tempranas postnatales y a partir de ese momento el paradigma imperante indica que la estabilidad de los circuitos establecidos se “fortalece” significativamente a partir de nuevas conexiones (plasticidad sináptica), más que por el agregado de nuevos elementos (neurogénesis). Es decir que si la neurogénesis existe

parecería ser como parte de un programa excepcional en el cual se dan todas las condiciones favorables para que algunos progenitores neuronales den origen a células que sobrevivan, a pesar de que muchas sufrirán el proceso de apoptosis (Biebl M, 2000), migren y se integren en circuitos pre-existentes. (Kuhn HG, 1996) (Kempermann G, 2003) (Stanfield BB, 1988) (van Praag H, 2002).

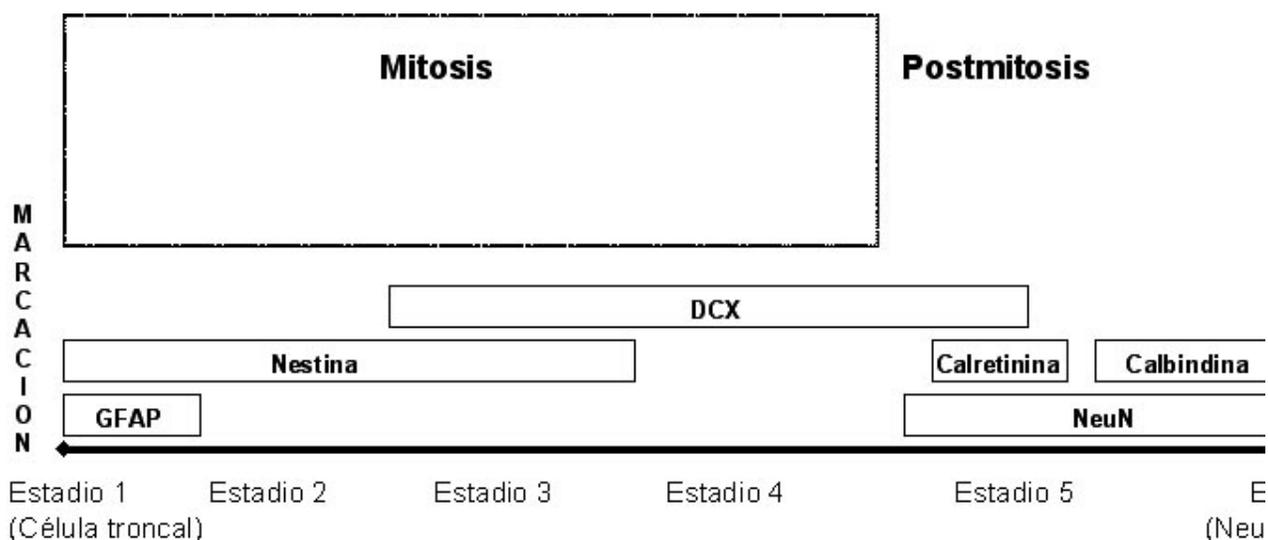
Kempermann y colaboradores proponen un modelo en seis etapas diferenciables morfológicamente y por la expresión de ciertas proteínas características.: (Kempermann G, 2004).



Foto 2

Foto 2: Corte frontal de un cerebro humano que muestra el hipocampo y el giro dentado (zona de neurogénesis). (Tinción de Nissl: se observan de coloración oscura las zonas correspondientes a cuerpos neuronales). La zona corresponde a la zona marcada con un rectángulo en la foto 1. Gentileza del Dr. Gabriel Fraticola.

En el estadio 1, en la zona germinal de la SGZ, las células troncales putativas (células con características de astrocitos radiales) (Seri B, 2001), comenzarían su división para dar origen a precursores pasajeros (células D), estadios 2 a 4, que serían los que finalmente darían origen a las nuevas neuronas granulares postmitóticas (Seri B, 2004). Estas células postmitóticas pasarían por una etapa temprana pasajera de establecimiento de conexiones (estadio 5), para finalmente ser seleccionadas como neuronas granulares maduras postmitóticas (estadio 6). (Brandt MD, 2003). En algunas etapas existiría un solapamiento de marcadores, siendo algunos de ellos específicos de un estadio. En el estadio 1, la célula troncal putativa expresa como marcador la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), típicamente glial. Este marcador no se observaría en los otros estadios. La proteína nestina (considerada un marcador de progenitores), en cambio se expresaría a lo largo de los estadios 1 a 3 con un solapamiento en el estadio 3 con la proteína doblecortina (DCX). La marca de DCX indicaría cierta restricción de linaje y persistiría durante los estadios 4 y 5. En este último estadio existiría un solapamiento entre las marcas de DCX, calretinina (neuronas inmaduras) y la proteína nuclear neuronal (NeuN). NeuN, marcador neuronal definitivo que continuaría presente en el estadio 6 con un solapamiento con la proteína calbindina, típica de neuronas maduras. (Figura 1). Como vemos el proceso de neurogénesis es un proceso complejo potencialmente regulable en diferentes etapas y en el cual la presencia de estadios transitorios podría estar hablando de mecanismos de control en los cuales todavía el destino fenotípico de la célula no está definido, mientras que en los estadios finales (parte de 4, 5 y 6), la célula ya estaría comprometida en su linaje, no solo neuronal sino quizás también en diversas tareas incluso neuroquímicas. Claro que el mecanismo descrito, si bien tiene sustento experimental, dista aún de estar completamente demostrado.



Tomado y modificado de Kempermann G., 2004.

Figura 1: Modelo de seis etapas con las marcas características en cada etapa. Se observa que la putativa célula troncal es la única célula de los estadios que expresa GFAP. Por otra parte, nestina, una proteína característicamente atribuida a células progenitoras se expresa hasta el límite entre los estadios 3 y 4. En este momento (Estadio 4), se producen cambios y la célula entraría en un punto de no retorno. La proteína DCX se expresa en los estadios 3, 4 y 5. Finalmente en el Estadio 6, la célula adquiere características de neurona grana, inmadura y madura sucesivamente. En esas etapas se producen expresiones de proteínas típicamente neuronales, NeuN. Estadios 5 y 6 se diferencian por la expresión de calretinina y calbindina respectivamente. Ver el texto.

4. La misteriosa célula troncal :

Desde hace unos años se tiene evidencia de que células de extirpe glial serían las células troncales del adulto involucradas en los procesos de neurogénesis anteriormente mencionados (Alvarez-Buylla A, 2001) . Las células gliales son las más numerosas en el cerebro e incluso persisten cuando gran parte de la población neuronal se ha visto anulada. Mientras que la microglía y los oligodendrocitos tienen propiedades funcionales relativamente específicas, los astrocitos son células con una enorme plasticidad funcional, involucradas en funciones como el soporte neuronal, la interacción con el endotelio para formar la barrera hematoencefálica, la absorción de neurotransmisores, el mantenimiento de la hemostasis y la producción de mediadores. Por otra parte los astrocitos mantienen una estrecha comunicación con las neuronas formando una verdadera unidad funcional (Fields RD, 2002) .

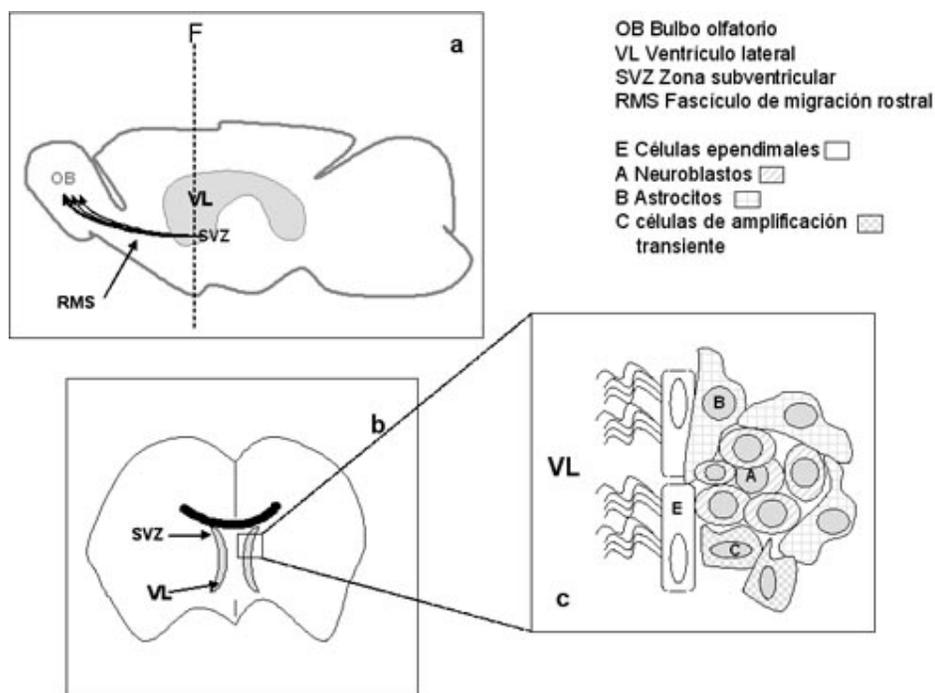
Clásicamente se ha considerado que durante la embriogénesis cerebral el neuroepitelio que recubre los ventrículos actuaría como reservorio de células troncales neuroepiteliales con la

bipotencialidad de dar origen a progenitores neuronales y progenitores gliales. La glía radial, se localiza en la zona ventricular extendiéndose hasta la superficie pial, sirviendo de matriz para la migración de las nuevas neuronas generadas en la zona ventricular a partir de las células troncales neuroepiteliales (Rakic P., 1972). Luego de la migración neuronal la glía radial se transformaría en astrocitos. El modelo clásico, supone entonces que la glía radial está comprometida con el linaje astrocitario y que la célula troncal es de origen neuroepitelial. (Voigt T., 1989).

Este modelo ha sido extrapolado al adulto, dando lugar a la idea de que las células endodimales podrían actuar como células troncales. Sin embargo, investigaciones recientes mostrarían que en realidad las células endodimales del adulto serían postmitóticas y derivarían de la glía radial durante la embriogénesis. Quedan de esta manera cuestionados dos modelos el de la glía radial como derivada del neuroepitelio ventricular y el de la putativa acción de célula troncal de la célula endodimal del adulto (Spassky N, 2005) .

En el cerebro adulto se aceptan sin dudas dos zonas de neurogénesis: la zona subventricular (SVZ), de los ventrículos laterales, que genera las neuronas que poblarán el bulbo olfatorio (Lois C, 1993) y la zona subgranular (SGZ), del hipocampo, que genera las neuronas granulares de dicha zona (Kaplan MS, 1977). De ambas regiones se han aislado células troncales, las cuales cultivadas con los factores adecuados dan origen a nuevas neuronas (Palmer TD, 1995) . Analizaremos brevemente la neurogénesis a partir de las células troncales en ambas zonas:

Zona subventricular: es un manto de células que se extiende recubriendo las paredes laterales de los ventrículos laterales. Las células que nacen a lo largo de la SVZ se agrupan en un cordón de neuroblastos migratrices que forman el fascículo de migración rostral (RMS), que une la SVZ con el bulbo olfatorio (OB). En el OB las células se diferencian en dos tipos de neuronas inhibitorias, las granulares y las periglomerulares (Doetsch F, 1996). La arquitectura de la SVZ y del RMS ha sido bien caracterizada (Figura 2) (Doetsch F, 1999) . Las células A (neuroblastos), migran en cadena de células homólogas, a través de un túnel formado por astrocitos en división (células B). A lo largo del túnel se observan racimos de células de división rápida (células C). Por otra parte, la SVZ está separada del ventrículo por una capa de células endodimales ciliadas. La secuencia sería, los astrocitos subventriculares (células B), con propiedades de célula troncal se autorregenerarían (esta comprobado in vitro), y darían origen a las células C que se dividen para dar las células A (neuroblastos) migratrices.



Tomado y modificado de Doetsch F., 2003

Figura 2: 2a; Se observa un esquema de un corte parasagital de cerebro de ratón en el cual se puede apreciar el ventrículo lateral (VL) y la zona subventricular (SVZ) donde se produce la neurogénesis. Las células producidas en esta región migraran como neuroblastos a través del fascículo de migración rostral (RMS), hacia el bulbo olfatorio (OB). 2b; en la figura 2a el eje F, esquematiza un corte frontal que pasaría por la zona descrita en 2b. Se observa SVZ , amplificada esquemáticamente en 2c. En 2c, se esquematiza la organización estructural de la SVZ. La pared ventrículo lateral (VL), está tapizada por una capa de células multiciliadas ependimales (E). las cadenas de neuroblastos (A), migran a través de un túnel formado por la astroglía (B). En diversos focos dispersos se observan células de división rápida (C). para más explicaciones ver el texto.

Zona subgranular del hipocampo: la neurogénesis en esta zona fue descrita en el apartado anterior, sin embargo, se puede intentar describir esta zona en forma análoga a lo que se hizo con la SVZ (Doetsch F., 2003) (Seri B, 2004).

Las neuronas del giro dentado (DG) nacen en la zona subgranular (SGZ), que se encuentra entre la capa de células granulares y el hilio. A diferencia de la gran distancia recorrida por las células de la SVZ, las neuronas nacidas en la SGZ recorren un corto trayecto hasta la zona granular del DG. Utilizando la nomenclatura arriba propuesta, la SGZ contiene astrocitos (Células B) y una población de células GFAP (-), ultraestructuralmente oscuras denominadas células D. De la misma manera que en la SVZ, los astrocitos actúan como los precursores neuronales primarios.

Vemos entonces que tanto en la SVZ como en la SGZ, los astrocitos son los precursores primarios, habiendo fuerte evidencia de que serian células troncales autorrenovables. Por otra parte se ha propuesto que las células ependimales multiciliadas podrían ser las células troncales en el adulto (Johansson CB, 1999). Sin embargo, el concepto que seria aceptado

recientemente es que las células endoteliales crearían un “nicho” neurogénico (Doetsch F., 2003), propicio para la neurogénesis a través de la producción del factor noggin un antagonista de la proteína morfogenética ósea (BMP) la cual promueve la diferenciación astrogliosa de la región (Lim DA, 2000), (Ver mas adelante “Regulación de la neurogénesis”).

En síntesis, la evidencia in vitro, básicamente obtenida a través de los estudios en cultivos con células que generan neuroesferas, indica que la glía actuaría como célula troncal. Sin embargo, los estudios que demuestren este rol in vivo, no son simples de llevar a cabo y los experimentos in vivo solo brindan una fuerte evidencia a favor de que las células gliales serían precursores neuronales y putativamente células troncales. Por otra parte pese a tener evidencia de que los astrocitos podrían ser las células troncales, queda aun el problema de definir claramente a que llamamos “astrocito”. La heterogeneidad de los astrocitos en el cerebro es grande y aun en el propio hipocampo existirían diferentes poblaciones de astrocitos con propiedades funcionales y morfológicas diferentes. (D'Ambrosio R, 1998) (Zhou M, 2001).

Como quiera que sea, identificar la estirpe de las células troncales neuronales del adulto in vivo es una tarea aun por realizar, cuyas consecuencias no serian menores. Si la astrogliosis en conjunto o una subpoblación de estas células son las células troncales del adulto que están en un estado latente a lo largo del cerebro, la siguiente cuestión de interés practico directo en el tema de la reparación del daño neuronal sería cómo se puede lograr que estas células troncales desarrollen neuronas nuevas en zonas de injuria y lo que no es menor aun, cómo lograr que las nuevas neuronas se integren en los circuitos existentes y sean funcionales.

5. Regulación de la neurogénesis:

Como hemos visto, la creación de una nueva neurona es un proceso complejo que en forma sintética incluye los pasos de proliferación de una célula troncal, diferenciación, migración e integración funcional. El fenómeno es altamente regulado y tiene numerosas etapas de control y de potencial detenimiento o vuelta atrás del proceso. Factores genéticos y epigenéticos, factores de crecimiento, neurotransmisores, hormonas y obviamente las condiciones ambientales son reguladores de la neurogénesis (Zhao X, 2003). Sin embargo, en forma sintética se pueden describir algunos pasos limitantes y mediadores fundamentales para entender el mecanismo de neurogénesis en el hipocampo adulto, una de las zonas relevantes por sus implicancias fisiológicas y clínicas, (Figura 3).

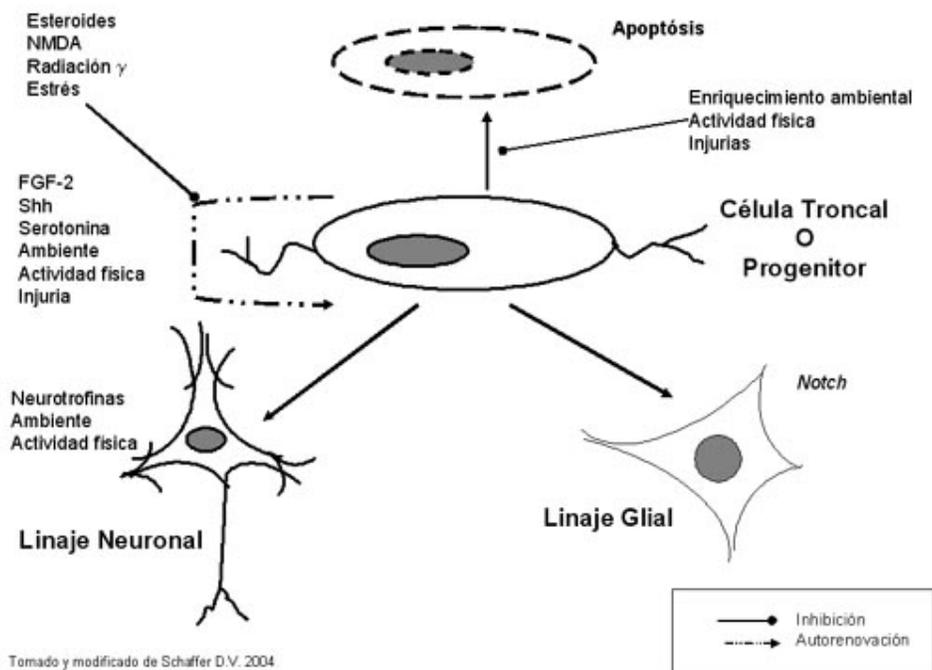


Figura 3: Esquema simplificado de la regulación del ciclo celular de la célula troncal hipocampal. Una mayor discusión se encuentra en el texto.

El factor fibroblástico básico (FGF-2), fue de las primeras moléculas que in vitro demostraron ser necesarias para promover la proliferación de los progenitores neurales (Ray J, 1993). Posteriormente in vivo se mostró también que FGF-2 tiene efectos mitogénicos neurales, describiéndose un cofactor necesario para su acción, la cistatina C glicosilada (CCg), sugiriéndose una necesaria colaboración de factores autócrinos y parácrinos para la estimulación de la neurogénesis (Taupin P, 2000). Por otra parte se ha encontrado una amplia distribución del receptor para FGF-2, (FGFR1), en diversas células del hipocampo, proponiéndose una interacción entre el FGF-2 astrocitario y FGFR1 neuronal. (Weickert CS, 2005) .

Recientemente, se ha observado que algunos de los efectos ambientales sobre la neurogénesis están mediados también por otro factor de crecimiento, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Cao L, 2004) .

Por otra parte, si bien es necesario un nicho local para el desarrollo del proceso de neurogénesis, se ha observado que un factor no presente en el hipocampo, el factor “Sonic hedgehog”, (Shh) , expresado en altas concentraciones en la corteza basal, en el cerebelo y motoneuronas (Traiffort E, 1999), es capaz de estimular poderosamente la neurogénesis hipocampal in vivo. Esto sugeriría una vía de regulación extrahipocampal a través de un transporte anterógrado de mediadores como Shh que actuarían sobre receptores de células troncales hipocampales (Traiffort E, 2001) (Lai K, 2003). Recientemente, la regulación de Shh

sobre la neurogénesis se ha extendido a la SVZ, en la cual actuaría sobre la astrogliá con putativas funciones de célula troncal (Palma V, 2005).

Independientemente de estos y otros factores proliferativos desconocidos, un punto de relevancia en la neurogénesis es el control de la diferenciación celular. Este proceso está bastante bien descifrado en la SVZ. En esta región se sabe que las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), proteínas de la familia de los factores de crecimiento transformantes (TGFs) son capaces de promover la diferenciación astrocitaria de los progenitores embrionarios. (Gross RE, 1996) . Por su parte noggin, otra proteína reguladora, se une a las BMPs y es capaz de inhibir su actividad promoviendo la diferenciación neuronal (Lim DA, 2000).

Recientemente se ha descrito un correceptor (DRAGON), para algunos de los miembros de las BMPs en el embrión. DRAGON potenciaría la acción de las BMPs, siendo esta acción inhibida por noggin (Samad TA, 2005) . Se estaría quizás en presencia de un mecanismo en el cual la función de ligando de algunas BMPs se produciría por defecto, siendo esta inhibida al desplazarse de la unión, factores como DRAGON por otros factores inhibitorios como noggin. De todas maneras resta mostrar que esta acción ocurra en la neurogénesis del adulto. Por otra parte, tampoco esta bien caracterizada la acción de noggin en regiones como el hipocampo adulto. Sin embargo se sabe que estímulos ambientales como tareas de aprendizaje espacial en ratas (prueba del laberinto acuático), incrementan la expresión de noggin en el hipocampo adulto (Fan XT, 2003), mientras que la inhibición de este factor a través de terapias antisentido inhibe la proliferación celular en dicha zona (Fan XT, 2004) .

Entre los factores que promueven la diferenciación in vitro y putativamente in vivo en el cerebro adulto, se ha destacado el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Maisonpierre PC, 1990. Además la sobreexpresión de este factor en la SVZ, aumenta la diferenciación neuronal (Benraiss A, 2001) Por otra parte otros experimentos indicarían que la acción de BDNF no es tan simple siendo este factor un regulador de la neuroadaptación a través de una estimulación o inhibición de la proliferación celular ambiente dependiente. Se ha visto que la sobreexpresión de BDNF persistente en el hipocampo de animales con injuria isquémica, contrarresta el aumento de neurogénesis que este evento produce (Larsson E, 2002) . Por otra parte, en un modelo de separación maternal temprana en ratas se han detectado niveles elevados de BDNF en presencia de una neurogénesis normal en los animales adultos. Los autores consideran que en este caso, que si bien los niveles de neurogénesis fueron iguales en los controles que en los animales separados de sus madres por largo tiempo, a pesar de los diferentes niveles de BDNF a favor de los últimos, esto se debería a un efecto compensador del BDNF, el cual compensaría los niveles de neurogénesis que deberían estar disminuidos en los animales separados tempranamente de sus madres y en los cuales se producirían altos niveles de estrés un factor ambiental inhibitorio de la neurogénesis. (Greisen MH, 2005). De todas maneras los efectos reales del BDNF como regulador o exclusivamente estimulador de la diferenciación neuronal, restan por ser elucidados in vivo, a pesar de lo mucho que se ha estudiado la

regulación de este factor. Por ejemplo, a nivel de plasticidad sináptica, el otro mecanismo de neuroadaptación, se ha sugerido hace varios años que los factores tróficos son reguladores, ambiente- dependiente (Thoenen H., 1995) .

Por último, luego de ver brevemente la proliferación y diferenciación neurales, resta por describir los mecanismos que hacen que una nueva neurona sobreviva y se integre a los antiguos circuitos. In vitro, tanto FGF-2 como Shh son capaces de promover además de la proliferación, la supervivencia neuronal (Ray J, 1993) (Lai K, 2003). Sin embargo, no están claros los mecanismos moleculares que regulan la supervivencia neuronal in vivo. El tema es del mayor interés, ya que si bien se produce neurogénesis a lo largo de la vida adulta, también se sabe que gran parte de las neuronas generadas entrarán en apoptosis. En trabajos recientes se sugiere que las nuevas neuronas entrarían en apoptosis en etapas tempranas de su diferenciación a través de un mecanismo Bax-dependiente. En ratones “knock outs” para el gen Bax no se observa apoptosis neuronal, sin embargo la proliferación de los progenitores neurales no se ha visto afectada. Es concebible que luego de la diferenciación, una apoptosis fisiológica Bax-mediada sea necesaria para que sólo se integren en los circuitos existentes aquellas neuronas necesarias y no haya una proliferación innecesaria (Sun W, 2004). Un tema a elucidar sería si la apoptosis es un mecanismo por defecto y de ser así cuáles serían las señales que en casos específicos la inhibirían. En modelos de isquemia cerebral en ratas se ha observado que VEGF tiene un efecto neuroprotector a través de inhibición de mecanismos de apoptosis y de neurogénesis (Sun FY, 2005). Dada la relación entre los efectos ambientales de VEGF y la neurogénesis en condiciones normales ((Cao L, 2004), sería interesante elucidar si la inhibición de la apoptosis en condiciones fisiológicas de neurogénesis es un mecanismo al menos parcialmente mediado por VEGF.

Durante el desarrollo embrionario, se ha mostrado recientemente que señales de tipo Notch participan en la supervivencia neuronal a través de mecanismos distintos de los clásicamente conocidos mecanismos regulatorios. Estas señales actuarían a través de una regulación positiva de los genes antiapoptóticos Bcl-2 y Mcl-1 (Oishi K, 2004) .

Es probable que en la vida adulta se mantengan los mecanismos clásicos de regulación apoptosis-supervivencia. Sin embargo no está claro qué hace que el balance se incline hacia uno u otro lado.

Para terminar este apartado de regulación de la neurogénesis es necesario mencionar el rol de los neurotransmisores. La inhibición o lesión de varias vías neuroquímicas afecta la neurogénesis. Por una parte la administración crónica de inhibidores de la recaptación de serotonina promueve la proliferación y supervivencia celular, mientras que la lesión de las proyecciones serotoninérgicas reduce la acumulación de nuevas neuronas hipocampales (Brezun JM, 1999) (Gould E., 1999). La importancia de este efecto de la serotonina y su

influencia sobre la neurogénesis en relación a la acción de los antidepresivos ya ha sido mencionada (Santarelli L, 2003).

Por otra parte la activación de los receptores de N-Metil-D-Aspartato (NMDA), inhibe la neurogénesis, mientras que el tratamiento con antagonistas del receptor NMDA, regulan positivamente la proliferación celular, diferenciación y supervivencia neuronal (Cameron HA, 1995) .

Recientemente se ha mostrado que una lesión de las aferencias colinérgicas sobre el hipocampo, tiene dos efectos sinérgicos, disminuye la neurogénesis y aumenta el nivel de apoptosis (Cooper-Kuhn CM, 2004) .

Otros estudios sugieren un rol en la depleción dopaminérgica sobre la proliferación de precursores neurales y el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. En los experimentos realizados en roedores, la eliminación de los precursores inducida por la ablación dopaminérgica es restaurada por agonistas de los receptores dopaminérgicos (Hoglinger GU, 2004) .

Lo expuesto muestra una indudable correlación entre la actividad de numerosos neurotransmisores y la proliferación, diferenciación neuronal y supervivencia. Sin embargo, dado lo complejo de las interacciones entre el ambiente, la homeostasis y otros factores tróficos, antes descritos, con los neurotransmisores es difícil establecer in vivo el origen de la cadena que desemboca en un incremento de una neurogénesis funcional. Probablemente, falten aún realizar experimentos in vitro para diseccionar finamente la cadena de eventos moleculares y biológicos.

6. ¿Para qué sirve la neurogénesis?

Como hemos deslizado más arriba, podría ser que la neurogénesis sea un resabio funcional más que realmente un mecanismo o parte de un mecanismo eficaz para el logro de algunas tareas cerebrales, más concretamente tareas cognitivas. Sin embargo, algunos de los hallazgos recientes parecen indicar que la neurogénesis está activamente involucrada en las funciones adjudicadas al hipocampo. (Shiner A. y Gage F., 2004)

La hipótesis propuesta es que las actividades cognitivas dependientes del hipocampo involucrarían el reclutamiento de nuevas neuronas en los circuitos neuronales del giro dentado. Supuestamente, dichas neuronas tendrían un rol central en el procesamiento, almacenamiento y eventual recuperación de nuevas memorias.

Hallazgos recientes de nuestro laboratorio trabajando con un modelo de red neuronal artificial, parecerían reforzar la hipótesis mencionada, sobre todo en términos de ventajas en la recuperación de nuevas memorias. (Weisz V. y Argibay P., 2006). Sin embargo, lo cierto es que la cuestión no ha sido elucidada con una evidencia experimental robusta, sobre todo debido a que los experimentos conductuales para evaluar la memoria episódica en la cual el hipocampo tendría un rol central no son sencillos ni lo suficientemente específicos.

En apoyo de la hipótesis del rol de la neurogénesis en las tareas del hipocampo, recientes experimentos con inhibición de la neurogénesis por irradiación local, muestran que ratas en las cuales se inhibió la neurogénesis se mostraron menos eficaces en la resolución de una prueba en la que se evaluó la memoria para eventos específicos. (Winocur G. et al., 2006). Sin embargo, estos resultados no han sido totalmente reproducibles por otros grupos, lo cual ha sido atribuido a las diferencias en los métodos utilizados para inhibir la neurogénesis. Probablemente se tengan resultados más precisos con la utilización de inhibidores específicos de la neurogénesis.

7. Neuroadaptación

El concepto de neuroadaptación involucra la interacción de dos sistemas extremadamente complejos, el medio ambiente con sus múltiples variables y el cerebro, prácticamente desconocido en sus mecanismos básicos. En general se ha definido la neuroadaptación en psiquiatría como un estado de habituación mediante el cual el organismo de un individuo altera su metabolismo cerebral, neurofisiología y personalidad, estableciendo un vínculo adictivo hacia una sustancia psicoactiva sin la cual presenta trastornos psicofísicos de diverso tipo. Sin embargo en neurobiología el término involucra aquellos cambios por los cuales el cerebro modifica su estructura y función no ya por una sustancia adictiva sino como consecuencia del ambiente todo. De alguna manera y en la época del cognitivismo, la neuroadaptación es un tipo de aprendizaje que involucra una modificación de la estructura cerebral en dos aspectos básicos, sus conexiones (plasticidad sináptica) y sus elementos (proliferación celular). El conocimiento de la neurogénesis en el cerebro del adulto y su regulación por cambios ambientales, tales como el estrés ha significado un gran avance no solo en neurobiología, sino en áreas como la geriatría o los trastornos del aprendizaje, sin hablar de las enfermedades psiquiátricas como la depresión y los trastornos neurológicos como la epilepsia y el infarto cerebral. Aun nuestros conceptos acerca de la denominada “mente” y los procesos cognitivos se modifican con el nuevo paradigma. Si bien, durante los últimos años la modelización cerebral ha girado en torno al denominado “enfoque conexionista” y a la interpretación de los mecanismos de procesamiento cerebral como los emergentes de un sistema de redes neuronales, debemos decir que si el cerebro se comporta aunque más no sea esquemáticamente como una red neuronal artificial (Rolls ET, 1998), ésta debe ser muy

particular ya que debería tener una arquitectura dinámica a dos niveles, la fuerza y el cambio de las conexiones (Hebb D.O, 1949) (Van Ooyen A., 2005), y el agregado y desaparición de nuevos componentes en el sistema (neurogénesis y apoptosis). Por otra parte es casi ínfimo lo que se sabe en relación a los procesos de gliogénesis y los cambios adaptativos durante procesos fisiológicos como el aprendizaje, cambios ambientales como el estrés y las diversas noxas que afectan al cerebro. Todo esto sin dejar de lado el hecho de que el cerebro recibe entradas y emite salidas hacia todo el organismo.

Referencias

- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965 Jun;124(3):319-35.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Apr;2(4):287-93.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 2001; 4: 1116–22.
- Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci*. 2001 Sep 1;21(17):6718-31.
- Bereyre FM, Kerschensteiner M, Raineteau O, Mettenleiter TC, Weinmann O, Schwab ME. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. *Nat Neurosci* 2004; 427: 740–744.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett*. 2000 Sep 8;291(1):17-20.
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci*. 2003 Nov;24(3):603-13.
- Brezun JM, Daszuta A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*. 1999;89(4):999-1002
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2003 May;17(10):2042-6
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2003 Dec 1;467(1):1-10
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci*. 1995 Jun;15(6):4687-92.
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, Doring MJ. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet*. 2004 Aug;36(8):827-35.

- Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002 Mar 31;134(1-2):13-21.
- Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Kuhn HG. Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res*. 2004 Jul 15;77(2):155-65.
- D'Ambrosio R, Wenzel J, Schwartzkroin PA, McKhann GM 2nd, Janigro D. Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci*. 1998 Jun 15;18(12):4425-38)
- Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol*. 2005 Jan 31;168(3):415-27.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14895-900.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999 Jun 11;97(6):703-16
- Doetsch F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Oct;13(5):543-50.
- Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2003 Nov;6(11):1127-34.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1313-7.
- Fan XT, Cai WQ, Yang Z, Xu HW, Zhang JH. Effect of antisense oligonucleotide of noggin on spatial learning and memory of rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2003 May;24(5):394-7
- Fan XT, Xu HW, Cai WQ, Yang H, Liu S. Antisense Noggin oligodeoxynucleotide administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett*. 2004 Aug 5;366(1):107-11.
- Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science*. 2002 Oct 18;298(5593):556-62.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci*. 2003 Jul;23(3):373-82.
- Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple sclerosis?. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 705–14.
- Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Apr;80(8):2390-4.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*. 1997 Apr 1;17(7):2492-8
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 27;96(9):5263-7.

Gould E. Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 1999 Aug;21(2 Suppl):46S-51S

Greisen MH, Altar CA, Bolwig TG, Whitehead R, Wortwein G. Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *J Neurosci Res*. 2005 Feb 2.

Gross RE, Mehler MF, Mabie PC, Zang Z, Santschi L, Kessler JA. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron*. 1996 Oct;17(4):595-606.

Hastings NB, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol*. 1999 Oct 11;413(1):146-54

Hastings NB, Seth MI, Tanapat P, Rydel TA, Gould E. Granule neurons generated during development extend divergent axon collaterals to hippocampal area CA3. *J Comp Neurol*. 2002 Oct 28;452(4):324-33

Hayes NL, Nowakowski RS. Dynamics of cell proliferation in the adult dentate gyrus of two inbred strains of mice. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002 Mar 31;134(1-2):77-85.

Hebb D.O. *The organization of Behavior*.. 1949 (Rimpresion 2002), LEA, New Jersey

Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci*. 2004 Jul;7(7):726-35.

Jessberger S, Kempermann G. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur J Neurosci*. 2003 Nov;18(10):2707-12

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999 Jan 8;96(1):25-34.

Kaplan MS, Hinds JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*. 1977 Sep 9;197(4308):1092-4.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997 Apr 3;386(6624):493-5.

Kempermann G. Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord*. 2002 Feb;4(1):17-33.

Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 2003 Jan;130(2):391-9

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*. 2004 Aug;27(8):447-52.

Klassen HJ, Imfeld KL, Kirov II, et al. Expression of cytokines by multipotent neural progenitor cells. *Cytokine* 2003; 22: 101–06.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 1996 Mar 15;16(6):2027-33.

- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci*. 2003 Jan;6(1):21-7
- Lai K, Robertson MJ, Schaffer DV. The sonic hedgehog signaling system as a bistable genetic switch. *Biophys J*. 2004 May;86(5):2748-57.
- Larsson E, Mandel RJ, Klein RL, Muzyczka N, Lindvall O, Kokaia Z. Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*. 2002 Sep;177(1):1-8.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 2000 Dec;28(3):713-26
- Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):2074-7
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*. 1990 Oct;5(4):501-9.
- Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol*. 1999 Apr 19;406(4):449-60.
- Martino Gianvito. How the brain repairs itself: New therapeutic strategies in inflammatory and degenerative CNS disorders *Lancet Neurol* 2004; 3: 372–78
- Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003; 302: 1760–65.
- Oishi K, Kamakura S, Isazawa Y, Yoshimatsu T, Kuida K, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y. Notch promotes survival of neural precursor cells via mechanisms distinct from those regulating neurogenesis. *Dev Biol*. 2004 Dec 1;276(1):172-84.
- Oweida AJ, Dunn EA, Foster PJ. Cellular imaging at 1.5 T: detecting cells in neuroinflammation using active labeling with superparamagnetic iron oxide. *Mol Imaging*. 2004 Apr;3(2):85-95.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Altaba AR. (Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*. 2005 Jan;132(2):335-44.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*. 1995 Oct;6(5):474-86
- Paton JA, Nottebohm FN. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*. 1984 Sep 7;225(4666):1046-8.
- Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol*. 1972 May;145(1):61-83.
- Ray J, Peterson DA, Schinstine M, Gage FH. Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3602-6
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992 Mar 27;255(5052):1707-10.

Rocheffort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM. (Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci*. 2002 Apr 1;22(7):2679-89)

Rolls ET, Treves A. Eds. *Neural Networks and Brain Function*. 1998, Oxford University Press, Oxford

Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci*. 1996 Oct;19(10):422-7

Samad TA, Rebbapragada A, Bell E, Zhang Y, Sidis Y, Jeong SJ, Campagna JA, Perusini S, Fabrizio DA, Schneyer AL, Lin HY, Brivanlou AH, Attisano L, Woolf CJ. DRAGON: a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem*. 2005 Jan 25

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 2003 Aug 8;301(5634):805-9

Schaffer DV, Gage FH. Neurogenesis and neuroadaptation. *Neuromolecular Med*. 2004;5(1):1-9.

Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001 Sep 15;21(18):7153-60

Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2004 Oct 25;478(4):359-78.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 2001 Mar 15;410(6826):372-6

Schinder AF, Gage FH. A Hypothesis About the Role of Adult Neurogenesis in Hippocampal Function. *Physiology* 2004; 19:253-261

Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci*. 2005 Jan 5;25(1):10-8.

Stanfield BB, Trice JE. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res*. 1988;72(2):399-406.

Sun FY, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. *J Neurosci Res*. 2005 Jan 1-15;79(1-2):180-4.

Sun W, Winseck A, Vinsant S, Park OH, Kim H, Oppenheim RW. Programmed cell death of adult-generated hippocampal neurons is mediated by the proapoptotic gene Bax. *J Neurosci*. 2004 Dec 8;24(49):11205-13

Tanapat P, Galea LA, Gould E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci*. 1998 Jun-Jul;16(3-4):235-9.

Taupin P, Ray J, Fischer WH, Suhr ST, Hakansson K, Grubb A, Gage FH. FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron*. 2000 Nov;28(2):385-97.

Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 1995 Oct 27;270(5236):593-8.

- Thomas RM, Peterson DA. A neurogenic theory of depression gains momentum. *Mol Interv.* 2003 Dec;3(8):441-4.
- Traiffort E, Charytoniuk D, Watroba L, Faure H, Sales N, Ruat M. Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *Eur J Neurosci.* 1999 Sep;11(9):3199-214.
- Traiffort E, Moya KL, Faure H, Hassig R, Ruat M. High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal sonic hedgehog in the adult hamster brain. *Eur J Neurosci.* 2001 Sep;14(5):839-50.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278–85.
- Van Ooyen A. Competition in neurite outgrowth and the development of nerve connections. *Prog Brain Res.* 2005;147:81-99.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 1999 Mar;2(3):266-70.)
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. (Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature.* 2002 Feb 28;415(6875):1030-4.)
- Videbech P, Ravnkilde B. (Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry.* 2004 Nov;161(11):1957-66.)
- Voigt T. (Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol.* 1989 Nov 1;289(1):74-88)
- Weickert CS, Kittell DA, Saunders RC, Herman MM, Horlick RA, Kleinman JE, Hyde TM. (Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in the human hippocampal formation. *Neuroscience.* 2005;131(1):219-33.
- Weisz V., Argibay P. A computational model of neurogenesis in the hippocampus: implications in episodic memory. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Atlanta, USA 2006. Enviado para su publicación *Journal of Neuroscience* 2006
- Winocur G., Wojtowicz JM., Sekeres M., Snyder JS. and Wang S. Inhibition of Neurogenesis Interferes With Hippocampus-Dependent Memory Function. *HIPPOCAMPUS* 2006; 16:296–304.
- Zhao X, Shaffer D.V, GageF.H Neurogenesis in the adult brain: understanding its mechanism and regulation. En: *Stem cells in the nervous system: Functional and Clinical implications.* 2003. Gage F.H, Bjorklund A, Christen Y. Eds. Foundation IPSEN, Springer-Verlag, Berlin. 2003
- Zhou M, Kimelberg HK. Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *J Neurosci.* 2001 Oct 15;21(20):7901-8.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 5, diciembre 2006

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 5, diciembre 2006

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

“La Homocisteína modifica las redes de Fibrina”

Ana María Lauricella

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis
Departamento de Química Biológica.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires.

[Versión para imprimir](#) 

Recibido 3/11/06. Aceptado 28/11/06.

Resumen

Actualmente, los niveles elevados de homocisteína constituyen un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular oclusiva, en particular para la trombosis. Sin embargo, los mecanismos involucrados no han sido esclarecidos.

Los objetivos de este trabajo fueron:

- Estudiar el efecto de la homocisteína sobre la estructura y lisabilidad de la fibrina.
- Evaluar el efecto de la homocisteína sobre el proceso fibrinolítico y sus componentes.

El análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica demostró que la homocisteína produjo redes compactas y ramificadas (52 ± 6 vs 44 ± 5 fibras/campo, $p = 0,008$), constituidas por fibras más cortas y gruesas que las del control, sugiriendo que su lisis podría estar afectada.

Los tiempos de lisis de redes de fibrina obtenidas en presencia de Hcy resultaron prolongados (257 ± 16 vs 187 ± 6 minutos, $p < 0,004$) cuando se utilizó el activador del plasminógeno tipo uroquinasa. Sin embargo, no se encontraron diferencias cuando se utilizó activador tisular del plasminógeno. Por otra parte, los tiempos de lisis de fibrina plasmática

formada en **ausencia** de homocisteína no resultaron diferentes de sus correspondientes controles. El aminoácido no modificó la actividad biológica de plasmina, plasminógeno, ni de sus activadores. Por lo tanto, la lisis dificultada estaría asociada a la estructura de la fibrina alterada por la homocisteína y no a la acción del aminoácido sobre los componentes fibrinolíticos evaluados.

Estos resultados sugieren que los pacientes hiperhomocisteinémicos producirían un coágulo con una estructura más compacta y más resistente a la lisis, generando un estado procoagulante *in situ*.

Este trabajo contribuye al conocimiento de los mecanismos nocivos asociados a la hiperhomocisteinemia.

Palabras claves: Homocisteína, trombosis, redes de fibrina, estructura, fibrinólisis.

Homocysteine modifies fibrin networks

Abstract

It has been established that elevated plasma homocysteine levels are an independent risk factor for vascular occlusive disease such as thrombosis. However, the pathophysiologic mechanisms involved in the deleterious effects of homocysteine still remain unclear.

The objectives of this work were:

- To study homocysteine effects on fibrin structure and lysis.
- To evaluate homocysteine effects on the fibrinolytic process and components involved.

Quantitative analysis of scanning electronic microscopy has shown that homocysteine-associated networks were more compact and branched than control (52 ± 6 vs 44 ± 5 fibers/field, $p = 0,008$), with shorter and thicker fibers. This tight structure suggests altered fibrinolysis.

The lysis time of homocysteine-related fibrin networks was longer (257 ± 16 vs 187 ± 6 min, $p < 0,004$) when urokinase type plasminogen activator was used. However, there were no differences with tissue-type plasminogen activator. On the other hand, fibrin networks prepared **without** homocysteine gave similar lysis time when lysis was performed by homocysteine pre-incubated urokinase-type plasminogen activator or the tissue-type plasminogen activator. Homocysteine did not modify biological activities of plasmin, plasminogen and the evaluated activators. Therefore, defective fibrinolysis with urokinase-type plasminogen activator was associated to homocysteine-fibrin structural alterations rather than to effects on the fibrinolytic components.

Results obtained suggest that hyperhomocysteinemic patients could produce tight clots, more resistant to lysis, generating a procoagulant environment *in situ*.

This work contributes to understand the mechanisms involved in the homocysteine harmful effect.

Key words: Homocysteine, thrombosis, fibrin networks, structure, fibrinolysis.

Introducción

Cuando se produce injuria en un vaso sanguíneo, la pérdida de sangre se detiene por la formación de un tapón hemostático constituido por plaquetas y una red proteica. El fibrinógeno (Fbg: abundante proteína en la circulación) se polimeriza por activación de los factores plasmáticos de la coagulación, formando una red denominada fibrina. Mientras se produce la reconstrucción del vaso dañado, el coágulo se disuelve por la acción del sistema fibrinolítico. La coagulación (formación de la red de fibrina) y la fibrinólisis (su disolución) deben ser comprendidas como un sistema dinámico cuyo fin es mantener una adecuada circulación sanguínea. El desequilibrio entre estos mecanismos provoca falta o exceso de coagulabilidad en el individuo.

Los vasos sanguíneos son conductos de diferente calibre por donde circula la sangre; pueden dilatarse o contraerse para regular el caudal necesario para cada condición o actividad. Su pared, la pared vascular, está formada por una serie de capas elásticas constituidas principalmente por colágeno, elastina y proteoglicanos, que le otorgan resistencia y contractilidad a los vasos. El interior de los vasos está tapizado por una única capa de células llamadas endoteliales, que participan activamente en conservar la luz del vaso, mediar el pasaje de nutrientes y otros solutos a los tejidos, sintetizar sustancias vasoactivas y muchas otras que van a participar en la coagulación y fibrinólisis. En condiciones normales el endotelio no activa la coagulación ni a las plaquetas para generar un trombo. Dicho de otro modo, el endotelio vascular es una superficie no trombogénica.

Las proteínas que constituyen el sistema de coagulación se llaman factores y generalmente se encuentran en circulación en forma de precursores enzimáticos inactivos. MacFarlane y Davie propusieron un sistema de reacciones consecutivas, donde una enzima activa a su sustrato, el cual se convierte a su vez en una enzima activa para el próximo sustrato, desencadenando un sistema de activación secuencial (1) que conduce a la formación de trombina, la principal enzima del sistema.

La trombina realiza múltiples funciones. Entre ellas, corta específicamente cuatro uniones aminoácidas de la molécula de Fbg, liberando péptidos denominados fibrinopéptidos A y B y generando monómeros de fibrina que se polimerizan dando origen a la red de fibrina

soluble. La trombina, además, activa al factor XIII. El factor XIII activado produce uniones covalentes entre las fibras de fibrina soluble generando fibrina estable (2).

La fibrina es degradada por la plasmina, enzima que deriva de la activación del plasminógeno por sus activadores: activador tisular del plasminógeno (t-PA) y activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA).

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido que contiene un grupo sulfhidrilo en su molécula. No es constituyente natural de las proteínas sino que es un producto intermedio en el metabolismo de la metionina. Su concentración en la circulación es muy pequeña: el límite superior de homocisteinemia en individuos sanos, con niveles vitamínicos óptimos es de 12 μ M (3-4). Existen muchos factores adquiridos que regulan los niveles de Hcy. La dieta es fundamental: el déficit de ácido fólico, vitaminas B_{12} , B_6 y/o B_2 conduciría/n a niveles plasmáticos elevados del aminoácido, un estado denominado de hiperhomocisteinemia (HHcy). El consumo abundante de alimentos de origen animal debería estar acompañado por cantidades adecuadas de frutas y vegetales frescos que aporten el nivel de ácido fólico suficiente para neutralizar la Hcy generada. La Hcy puede formar compuestos disulfuro con moléculas que contienen grupos tioles, como el aminoácido cisteína o proteínas que tengan libre el sulfhidrilo de los residuos cisteína (5).

Los niveles plasmáticos elevados de Hcy (hiperhomocisteinemia: HHcy), están asociados a muchas alteraciones: neurológicas (6-7), complicaciones obstétricas (8-9), efectos teratogénicos (10), enfermedad aterotrombótica (11-12). Se ha encontrado asociación positiva entre niveles elevados de Hcy y las distintas formas de la enfermedad arterial: infarto de miocardio (13-14), accidente cerebrovascular (15), y venosa: trombosis venosa profunda (16), tromboembolismo pulmonar (17) o venoso (18-19), de modo que la Hcy elevada constituye un importante factor de riesgo independiente para la enfermedad aterotrombótica, afectando al sistema vascular coronario, cerebral y periférico (20-23). La magnitud del riesgo es similar a la de otros factores tales como colesterol elevado, tabaquismo, hipertensión y diabetes que, a su vez, ejercen un efecto multiplicativo cuando se combinan con hiperhomocisteinemia.

Entre los efectos nocivos de la Hcy se ha demostrado la generación de especies oxigenadas, altamente reactivas (peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y superóxido), que inducirían injuria en el endotelio vascular (24-25). Se ha sugerido (26) que la HHcy afectaría la vasodilatación del endotelio (por disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico) y las propiedades elásticas de la pared arterial (27) (por el aumento en la síntesis y entrecruzamiento de las fibras de colágeno). Los resultados del efecto de la HHcy sobre las plaquetas y la actividad de los factores de coagulación y el sistema fibrinolítico son contradictorios. Se evidencia un estado hipercoagulable en los pacientes homocistinúricos. Mientras algunos estudios no pudieron vincular HHcy con alteraciones de la actividad de los factores de coagulación (28) ni de la actividad fibrinolítica (29), recientemente se ha informado (30) que la HHcy incrementó la velocidad de coagulación, y disminuyó la actividad fibrinolítica.

A pesar de la extensa bibliografía que apoya la asociación entre HHcy y enfermedad vascular oclusiva, no se ha llegado aún a un consenso sobre los principales mecanismos responsables de esta interacción. La mayoría de los estudios publicados han evaluado la acción de la Hcy en los procesos previos a la generación del trombo; en cambio, en el presente trabajo se ha investigado la estructura de las redes de fibrina y el proceso de lisis posterior.

Para contribuir a dilucidar los mecanismos involucrados en la asociación de los niveles elevados de Homocisteína con el riesgo de enfermedad vascular oclusiva, se evaluó el efecto *in vitro* del aminoácido sobre la estructura y lisis de la fibrina. Además se estudió el efecto de la Hcy sobre componentes del proceso fibrinolítico: plasmina, plasminógeno y activadores del plasminógeno.

Materiales y Métodos:

Obtención de fibrina

La acción de la trombina sobre el fibrinógeno en solución produce una serie de eventos que culminan con la formación de un gel, cuyo componente sólido (esqueleto) es la fibrina. En los distintos estudios se utilizó una mezcla de plasmas citratados libres de plaquetas, provenientes de individuos normales (*PN**). Alícuotas de *PN**, se incubaron 1 hora, a 37°C con soluciones de la mezcla racémica (DL)-Hcy a diferentes concentraciones. La muestra control se obtuvo reemplazando la solución de Hcy por solución fisiológica (SF). Se utilizó trombina (Trb) y CaCl₂ para coagular una alícuota de la mezcla plasmática preincubada con Hcy o SF. Los efectos de la Hcy sobre la fibrina fueron evaluados mediante microscopía electrónica y estudios líticos.

Estudio de las redes de fibrina por microscopía electrónica

Modificaciones de la estructura de la red de fibrina pueden conducir a fibrinas muy débiles e ineficientes o, por el contrario, a densas tramas difíciles de lisar. Con el fin de esclarecer si la Hcy produce algún efecto sobre la estructura de la fibrina, se obtuvieron geles de fibrina plasmática obtenidos a partir de mezcla de plasmas preincubados con el aminoácido y posteriormente estabilizados. Las muestras se fijaron con glutaraldehído (30%)-paraformaldehído (2,5%) durante 2 horas; se lavaron con *buffer* cacodilato y fueron postfijadas con tetróxido de osmio (1%). Luego fueron deshidratadas con soluciones de acetona en agua en concentraciones crecientes (50, 70, 85 y 100 %). Las muestras se secaron por punto crítico (Baltec CPD 030, Balzers, Alemania) y fueron metalizadas para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido (Carl Zeiss DMS 940 A, Oberkochen, Alemania) (31). Las observaciones se realizaron a 5 kV y se obtuvieron las fotografías correspondientes para cuantificar las dimensiones de las fibras. Las mediciones sobre las fotografías de las observaciones microscópicas se realizaron con el programa Image J. Se evaluaron al menos

10 campos de igual área, aleatoriamente seleccionados y se caracterizó cada red midiendo: número de fibras por campo, % de red (relación porcentual entre la superficie ocupadas por las fibras respecto al área total del campo), ancho y largo de las fibras.

Determinación de la actividad del sistema plasminógeno-plasmina

Para estudiar la acción de la Hcy sobre la actividad de componentes del sistema fibrinolítico, se utilizó un método cinético que evaluó el efecto dosis-respuesta a distintas concentraciones de Hcy sobre la actividad de plasmina y la activación del Plg.

Evaluación de la lisis de fibrina

Para evaluar la lisis se utilizó un sistema en dos etapas, separando la formación de la fibrina de su lisis. Si la Hcy se coloca antes de formarse la fibrina se estará evaluando la lisabilidad, como propiedad asociada a la estructura de la fibrina. Si se coloca la Hcy junto con el activador del Plg al analizar la lisis de redes iguales, se evalúa exclusivamente el efecto del aminoácido sobre el sistema fibrinolítico.

Se formaron geles de fibrina plasmática utilizando la mezcla plasmática preincubada en presencia de distintas concentraciones de Hcy (c.f. = 500 y 100 μ M) con Trb (c.f.: 0,25 UI/ml) y CaCl_2 (c.f.: 33 mM). Sobre los geles estabilizados se agregó una solución de u-PA (25 UI/pocillo) o t-PA (10 UI/pocillo) en un volumen de 70 μ l. Se monitoreó la DO a 405 nm en función del tiempo.

Resultados

Efecto de Hcy sobre la estructura de las redes de fibrina

En la Figura 1 se muestran las imágenes de las redes de fibrina obtenidas con 3.000 aumentos a partir de plasma preincubado con Hcy 500 μ M y las correspondientes controles. La caracterización de las mismas Figura en la Tabla 1.

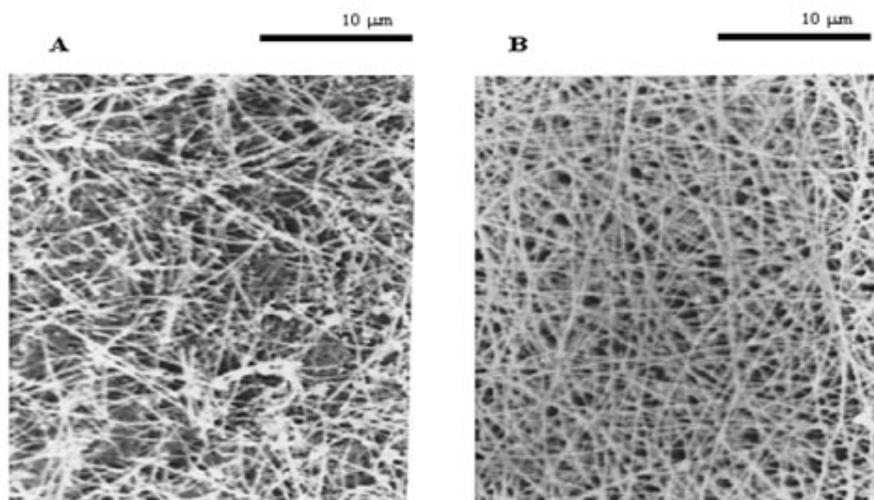


Figura 1: Redes de fibrina plasmática observadas por microscopía electrónica de barrido: A: SF, B: Hcy 500 μM.

Tabla 1: Caracterización de las redes de fibrina por microscopía electrónica.

	N	Control	Hcy 500 μM	p
Nº Fib/campo	10	44 ± 5	52 ± 6	0,008
% Red	10	67 ± 10	79 ± 8	0,001
Largo (μm)	250	1,04 ± 0,25	0,68 ± 0,17	0,001
Ancho (μm)	250	0,17 ± 0,04	0,29 ± 0,10	0,001

Resultados expresados como promedio y desvío estándar. El análisis estadística de los resultados se realizó por el método de Mann Witney – Wilcoxon (para Nº Fib/campo y % Red) y el test de Student (para largo y ancho de las fibras).

Las redes de fibrina obtenidas en presencia de Hcy 500 μM, resultaron más compactas y ramificadas que las controles. En presencia de Hcy se formaron redes de fibrina con mayor número de fibras/campo y que esas fibras son más gruesas y cortas que las correspondientes a la fibrina control.

Efecto de Hcy sobre los componentes del sistema plasminógeno-plasmina

Las redes de fibrina formadas en presencia de Hcy mostraron diferente estructura, sugiriendo que serían más resistentes a la lisis. Además, el aminoácido podría afectar la actividad biológica de los componentes del sistema plasminógeno-plasmina, modificando la actividad fibrinolítica. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se desarrollaron estudios cinéticos que permitieron estudiar el efecto de la Hcy sobre:

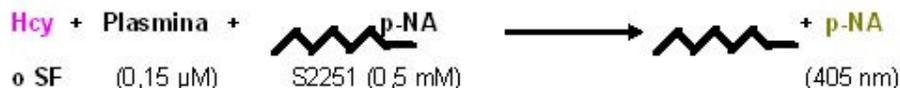
- **la actividad del sistema plasminógeno-plasmina**, evaluando
 - la actividad de la plasmina y
 - la activación del plasminógeno.
- **la lisis de redes de fibrina**, estudiando

- la lisabilidad de la fibrina obtenida en presencia de Hcy.
- la lisis de redes estándar de fibrina (en ausencia de Hcy).

Acción de Hcy sobre la actividad amidolítica de plasmina

El sustrato natural de la plasmina es la fibrina. La plasmina corta uniones péptidicas particulares de la fibrina, pero también puede ejercer su acción sobre fragmentos peptídicos que contengan los sitios específicos de corte. Existen reactivos capaces de evidenciar la acción de la enzima denominados sustratos cromogénicos y la actividad enzimática sobre ellos se denomina actividad amidolítica. El sustrato cromogénico contiene para-nitro anilina (p-NA), de modo que mientras que la p-NA liberada por la acción de la plasmita es color amarillo (absorbe a 405 nm), el sustrato cromogénico es incoloro (no absorbe a 405 nm). Por lo tanto la actividad de la plasmina es proporcional a la intensidad del color desarrollado y puede cuantificarse.

Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de Hcy (62,5; 125; 250; 500 y 1000 μM) sobre la acción amidolítica de Plm, frente a su sustrato cromogénico específico S-2251 (Chromogenix, Milán Italia), en solución reguladora a pH 7,5 determinando la liberación de p-NA (a 405 nm) en función del tiempo, utilizando un lector de ELISA (Reader 100, Organon Técnica, EE.UU) (32). Cada ensayo fue realizado por triplicado.



Se caracterizaron las curvas obtenidas determinando la pendiente y la DO máxima. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Parámetros que caracterizan las curvas de actividad amidolítica de plasmina a distintas concentraciones de Hcy.

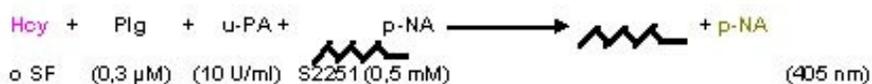
	Pendiente (min^{-1})	DO _{max}
SF	0,064 \pm 0,005	1,58 \pm 0,02
Hcy 63 μM	0,065 \pm 0,003	1,60 \pm 0,01
Hcy 125 μM	0,065 \pm 0,004	1,59 \pm 0,02
Hcy 250 μM	0,063 \pm 0,003	1,59 \pm 0,01
Hcy 500 μM	0,061 \pm 0,005	1,59 \pm 0,02
Hcy 1.000 μM	0,061 \pm 0,004	1,61 \pm 0,02

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa Sigma-Plot. Ninguno de los resultados con Hcy mostró diferencias significativas respecto a los de los controles,

indicando que la Hcy ensayada en un amplio rango de concentraciones (62,5; 125; 250; 500 y 1000 μM), no modificó la actividad amidolítica de plasmina (Tabla 2).

Acción de la Hcy sobre la activación de plasminógeno con uroquinasa

Se evaluó la acción de distintas concentraciones de Hcy (4, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 $\mu\text{g/ml}$) sobre Plasminógeno (Plg: c.f. = 0,3 μM) activado por u-PA (c.f. = 10 U/ml) mediante el uso de un método cinético, evaluando la acción amidolítica de la plasmina generada sobre el sustrato cromogénico específico S-2251 (c.f. = 0,5 mM), en solución reguladora a pH 7,5. Cada ensayo fue realizado en tres oportunidades diferentes, cada una de ella por triplicado.



Se incubó Plg con Hcy en las concentraciones indicadas (1 h a 37 °C) y se realizó el ensayo cromogénico, en las mismas condiciones experimentales. Los valores de las curvas cinéticas obtenidas figuran en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros que caracterizan las curvas de actividad amidolítica de plasmina (por activación de Plg con u-PA) a distintas concentraciones de Hcy.

	Fase Lag (min)	Pendiente (min^{-1})	DO _{max}
PBS	7,1 \pm 0,2	0,046 \pm 0,007	1,827 \pm 0,02
Hcy 63 μM	6,9 \pm 0,5	0,049 \pm 0,001	1,820 \pm 0,03
Hcy 125 μM	7,0 \pm 0,3	0,049 \pm 0,002	1,796 \pm 0,05
Hcy 250 μM	7,2 \pm 0,2	0,046 \pm 0,004	1,799 \pm 0,04
Hcy 500 μM	7,0 \pm 0,4	0,046 \pm 0,002	1,790 \pm 0,03
Hcy 1.000 μM	6,9 \pm 0,3	0,046 \pm 0,002	1,801 \pm 0,04

Los resultados indicaron que el Plg preincubado con distintas concentraciones de Hcy (62,5; 125; 250; 500 y 1000 μM), no mostró variaciones en la cinética de reacción. En este ensayo se estudia simultáneamente la activación de Plg y la actividad de Plm. Como la actividad de plasmina no se vio modificada por la Hcy, podemos decir que la Hcy tampoco modificó la activación de plasminógeno en estas condiciones experimentales.

Efecto de Hcy sobre la fibrinólisis

De las curvas obtenidas se determinaron los **tiempos de lisis 50 %** –tiempo desde el instante que se agrega al activador del plasminógeno sobre la fibrina hasta alcanzar el valor de DO correspondiente a la mitad del descenso total de DO.

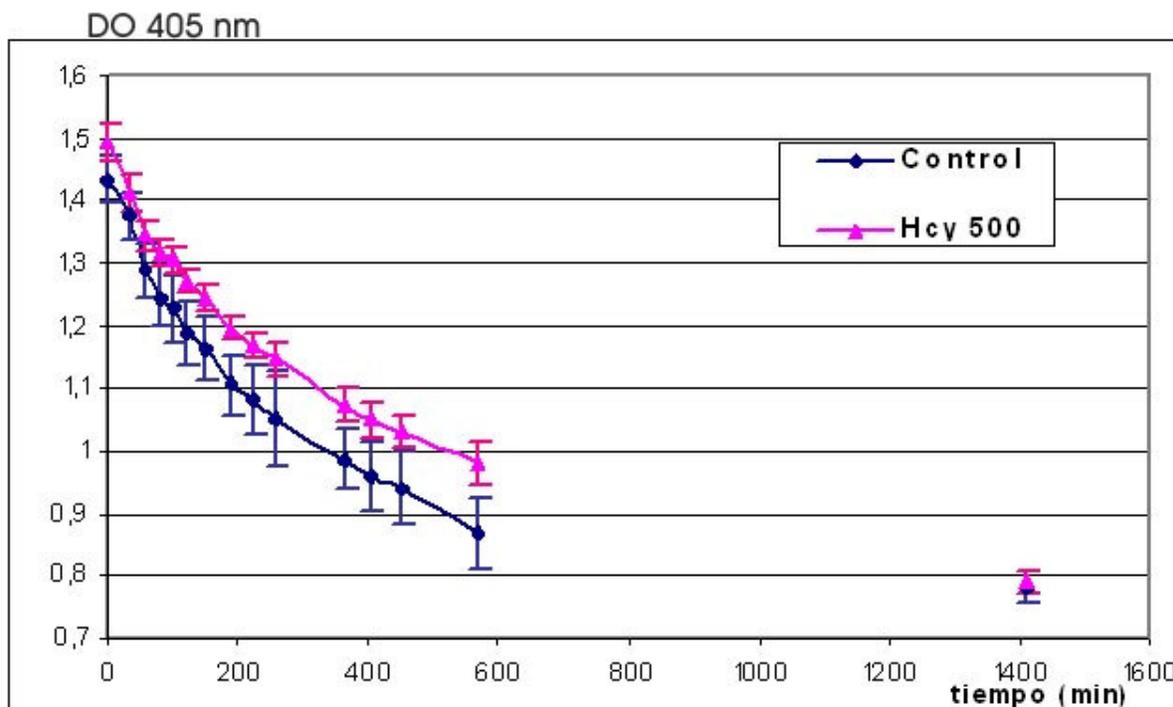


Figura 2: Lisis de fibrina formadas en presencia Hcy utilizando u-PA como activador del plasminógeno.

Como se observa en la Tabla 4, la fibrina obtenida en presencia de Hcy (500 μ M) se lisó más lentamente que la control cuando u-PA fue el activador de plasminógeno utilizado, indicando que la lisis de fibrina en presencia de Hcy está dificultada.

Tabla 4: Tiempos de lisis media de fibrina formada con Hcy, utilizando u-PA como activador de plasminógeno.

	t lisis (min)	p
Control	187 \pm 6	
Hcy	257 \pm 36	< 0,004

Por otra parte, no se detectaron cambios significativos cuando el activador de plasminógeno usado fue t-PA (Tabla 5).

Tabla 5: Tiempos de lisis media de fibrina obtenida con Hcy, utilizando t-PA

	t lisis (min)	p
Control	600 ± 30	
Hcy	620 ± 25	NS

Efecto de Hcy sobre la lisis de redes plasmáticas iguales

Se formaron redes de fibrina plasmática a partir de plasma (c.f. = 50 %), con trombina bovina (c.f. = 25 U/ml), y CaCl₂ (c.f. = 33 mM), de manera que todas las redes formadas en esta experiencia fueron iguales. Sobre las redes estabilizadas se agregaron:

a) u-PA: (50 U/pocillo) + Hcy (c.f. = 500 μM).

Control: u-PA: (50 U/pocillo) + SF

b) t-PA (20 U/pocillo) y Hcy (c.f. = 500 μM).

Control: t-PA: (20 U/pocillo) + SF

Los tiempos de lisis con (u-PA + Hcy) o (t-PA + Hcy) de fibrina plasmática formada en ausencia de Hcy, no resultaron diferentes de sus correspondientes controles (datos no mostrados), lo que indicaría que la actividad de los componentes del sistema fibrinolítico no se vio afectada por el aminoácido.

Discusión

La trombosis es considerada una patología multicausal resultante de la interacción de factores genéticos y adquiridos. Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado la asociación entre los niveles elevados de Hcy y enfermedad vascular. Actualmente, la hiperhomocisteinemia es considerada un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular oclusiva y en particular para la trombosis. Se han realizado numerosas experiencias *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales con el fin de interpretar la relación entre hiperhomocisteinemia y enfermedad aterotrombótica, sin embargo los mecanismos involucrados no han sido esclarecidos. La mayoría de los investigadores han estudiado la disfunción endotelial y la actividad procoagulante entre otros efectos dañinos de los niveles elevados de Hcy, evaluando eventos que preceden a la formación del trombo, pero pocos (33) han investigado sobre los efectos del aminoácido luego de iniciado el proceso de coagulación. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar si la Hcy podría ser responsable de alteraciones en la fibrina. Por estudios de microscopía electrónica, se comprobó que la Hcy produjo cambios

en la estructura de la fibrina plasmática, de modo que se formaron redes compactas y ramificadas, constituidas por fibras más cortas y gruesas que las del control.

Sauls y colaboradores (33) mostraron imágenes obtenidas por MEB, de fibrina de plasmas de conejos inyectados intraperitonealmente con DL-Hcy. A semejanza de nuestros resultados, estos autores muestran que los coágulos plasmáticos de animales hiperhomocisteinémicos parecen estar compuestos por fibras más densamente empaquetadas.

Para dilucidar si esta estructura densa podría inducir fibrinólisis defectuosa, se llevaron a cabo experimentos que evaluaron su lisabilidad. Por otro lado, los niveles aumentados de Hcy podrían modificar la cinética de generación de plasmina y/o su actividad biológica. Por lo tanto, se evaluó además, el efecto del aminoácido sobre componentes del sistema plasminógeno-plasmina.

Los resultados obtenidos con u-PA y t-PA se discutirán separadamente. A continuación se discuten las experiencias realizadas con u-PA. Los resultados de la Figura 2 y Tabla 4 muestran que la fibrina asociada a Hcy resultó más difícil de lisar cuando se utilizó u-PA. Por el contrario, cuando se lisaron geles obtenidos en “ausencia de Hcy”, con u-PA preincubado con Hcy, se obtuvieron los mismos tiempos de lisis que el control (u-PA preincubado con SF). Por otra parte, el aminoácido no mostró efecto en la actividad de plasmina (Tabla 2) ni en la activación del Plg (Tabla 3) determinadas por el método amidolítico utilizado, sugiriendo que la Hcy no afectaría a los componentes fibrinolíticos evaluados. Weisel y colaboradores mostraron que la velocidad de fibrinólisis está estrechamente relacionada con el tamaño de las fibras y la arquitectura de la red de fibrina (34). La plasmina corta transversalmente fibras individuales, de modo que fibras gruesas son más lentamente lisadas que las finas (35). Por otra parte, redes de fibrina ramificadas y compactas son digeridas con mayor dificultad a causa de la elevada cantidad de fibras por unidad de volumen y la baja difusión de componentes fibrinolíticos en esta estructura compacta (36). Por lo tanto, considerando que la Hcy indujo redes de fibrina densas y ramificadas, puede postularse que la lisis prolongada con u-PA, estaría más asociada a la estructura compacta de la fibrina que a modificaciones en la actividad biológica de los componentes fibrinolíticos evaluados.

Respecto a la lisis inducida por t-PA de redes de fibrina producidas en presencia de Hcy, se observaron resultados similares al control (Tabla 4). Según lo descripto para el u-PA, la estructura compacta de la fibrina asociada a la Hcy debería haber mostrado tiempos de lisis prolongados. Sin embargo el mecanismo de acción diferente del t-PA explicaría los resultados inesperados. La fibrina, el principal sustrato de la plasmina, une Plg y t-PA y acelera la activación del Plg, mientras que el u-PA no tiene afinidad por la fibrina y activa Plg en fase fluida. La eficiencia de la fibrina como cofactor de la activación del Plg depende de la arquitectura de las fibras: fibras gruesas resultan mejor cofactor (37). Entonces, la estructura densa de la fibrina asociada a Hcy sería, por un lado, más difícil de lisar, pero por otro, las fibras más gruesas proveen más sitios de unión a t-PA, favoreciendo la activación del Plg.

Estos efectos contrapuestos explicarían que los tiempos de lisis obtenidos con t-PA no mostrarán diferencias entre las redes con Hcy y las controles.

Estos resultados coinciden con los reportados en la bibliografía. Sauls *et al*/ encontraron disminuida la lisabilidad con plasmina, de fibrina obtenida a partir de Fbg aislado de plasma de conejos a los que se administró DL-Hcy (33).

En conclusión, los tiempos de lisis de redes de fibrina obtenidos en presencia de Hcy resultaron prolongados cuando se utilizó u-PA. Esta alteración estaría asociada a la estructura de la fibrina, causados por la Hcy y no a la acción del aminoácido sobre la actividad biológica de los componentes fibrinolíticos evaluados (Plg, plasmina, u-PA y t-PA).

Este trabajo fue totalmente realizado *in vitro* para separar los diferentes efectos que ejerce la Hcy y poder postular mecanismos que expliquen la asociación entre HHcy y enfermedad vascular oclusiva. Extrapolar estos resultados a lo que podría pasar *in vivo* tendrían importantes consecuencias, ya que podría inferirse que los pacientes hiperhomocisteinémicos producirían un coágulo con una estructura más compacta y más resistente a la lisis, generando un estado procoagulante *in situ*. Además, la acción de las drogas trombolíticas estaría dificultada. La obstrucción en la circulación conduciría a la alteración de la reología normal y a la secuencia de eventos que desembocarían en enfermedad aterotrombótica. Los resultados de este trabajo contribuyen a dilucidar los mecanismos involucrados en la asociación de la hiperhomocisteinemia y el riesgo de trombosis.

ABREVIATURAS

c.f.	Concentración final
DO	Densidad Óptica
Fbg	Fibrinógeno
Hcy	Homocisteína
HHcy	Hiperhomocisteinemia
Plg	Plasminógeno
Plm	Plasmina
p-NA	para-nitro anilina
SF	Solución Fisiológica
t-PA	Activador tisular del Plasminógeno
Trb	Trombina
u-PA	Activador del Plasminógeno, tipo uroquinasa

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Buenos Aires, subsidio (TX 295).

Referencias

1. **Davie E, 1995.** Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thomb Haemost* 74:1-6
2. **Bithell TC.** Blood coagulation. En Wintrobe's Clinical Hematology. Tomo I. *Lea & Febiger editores, 9ª edición, Londres, 1993; Pag 566-615.*
3. **Ubbink J, Becker P, Hayward Vermaak WJ, et al, 1995.** Results of B-Vitamin supplementation study used in a prediction model to define a reference range for plasma homocysteine. *Clin Chem; 41:1033-1037.*
4. **Rasmussen K, Moller J, Lyngbak M, et al, 1996.** Age and gender-specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. *Clin Chem* 42:630-636.
5. **Ueland M, 1995.** Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 41:340-342.
6. **Nourhashemi F, Gillette-Guyonnet S, Andrieu S, et al, 2000.** Alzheimer disease: protective factors. *Am J Clin Nutr* 71:643S-649S.
7. **Regland B, Andersson M, Abrahamson L, et al, 1997.** Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand J Rheumatol* 26:301-307.
8. **Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, et al, 2000.** Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study. *Am J Clin Nutr* 71:962-968.
9. **Cotter AM, Molloy AM, Scott JM, et al, 2001.** Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 185:781-785.
10. **Mc Mullin MF, Young PB, Bailie KE, et al, 2001.** Homocysteine and methylmalonic acid as indicators of folate and vitamin B₁₂ deficiency in pregnancy. *Clin Lab Haematol* 23:161-165.
11. **Van Guldener C, Stehouwer C, 2000.** Hyperhomocysteinemia, vascular pathology and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 26:281-289.
12. **Welch GN, Loscalzo J, 1998.** Homocysteine and atherothrombosis. *N England J Med* 338:1042-1050.
13. **Malinow MR, Ducimetiere P, Luc G, et al, 1996.** Plasma homocyst(e)ine levels and graded risk for myocardial infarction: finding in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 26:27-34.

14. **Morris MS, Jacques PF, Rosenberg TH, et al, 2000.** Serum total homocysteine concentration is related to self-reported heart attack or stroke history among men and women in the NHANES III. *J Nutr* 130:3073-3076.
15. **Miller JW, 1999.** Homocysteine and Alzheimer's disease. *Nutr Rev* 57:126-129.
16. **Den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WB, et al, 1995.** Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 345:882-885.
17. **Falcon CR, Cattaneo M, Panzeri D, et al, 1994.** High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb* 14:1080-1083.
18. **Ray JG, 1998.** Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Inter Med* 158:2101-2116.
19. **Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, et al, 1997.** Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation* 95:1777-1782.
20. **Ebbesen LS, 2004.** Hyperhomocysteinemia, thrombosis and vascular biology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 50:917-30.
21. **D'Angelo A, Selhub J, 1997.** Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 90:1-11.
22. **Bos MJ, van Goor ML, Koudstaal PJ, et al, 2005.** Plasma homocysteine is a risk factor for recurrent vascular events in young patients with an ischaemic stroke or TIA. *J Neurol* 252:332-7.
23. **Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al, 1997.** Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project. *JAMA* 277:1775-1781.
24. **Misra H, 1974.** Generation of superoxide free radical during the autooxidation of thiols. *J Biol Chem* 249:2151-2155.
25. **Lambert J, van der Berg, Steyn M, et al, 1999.** Familial hyperhomocysteinemia and endothelium- dependent vasodilation and arterial distensibility of large arteries. *Cardiovasc Res* 42:743-51.
26. **Mujumdar V, Aru G, Tgagi S, 2001.** Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function. *J Cell Biochem* 82:491-500.
27. **Majors A, Ehrhart L, Pezacka E, 1997.** Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2074-2081.
28. **Quintana I, 2003.** Acción de la homocisteína sobre el sistema hemostático. *Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.*

29. **Sabovic M, Blinc A, 2000.** Biochemical and biophysical conditions for blood clot lysis. *Eur J Physiol* 440 [Suppl]: R134-R136.
30. **Chia S, Wilson R, Ludlam CA, et al, 2005.** Endothelial dysfunction in patients with recent myocardial infarction and hyperhomocysteinaemia: effects of vitamin supplementation. *Clin Sci* 108:65-72.
31. **Sugo T, Nakamikawa C, Yoshida N et al, 2000.** End-linked homodimers in fibrinogen Osaka VI with a B β -chain extension lead to fragile clot structure. *Blood* 96:3779-85.
32. **Carr ME, Alving BM, 1995.** Effect of fibrin structure on plasmin-mediated dissolution of plasma clots. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 6:567-573.
33. **Sauls DL, Wolberg AS, Hoffman M, 2003.** Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J Thromb Haemost* 1:300-6.
34. **Weisel J, Veklich Y, Collet J Francis C, 1999.** Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy. *Thromb Haemost* 82:277-282.
35. **Collet JP, Park D, Lesty C, et al, 2000.** Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed. Dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1354-1361.
36. **Kolev K, Machovich R, 2003.** Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 89:610-21.
37. **Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM, 1992.** The effect of fibrin structure in fibrinolysis. *J Biol Chem* 267:24259-24263.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 3, año 5, diciembre 2006

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

