



UABJO

Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca

Oaxaca, México

ISSN: 2594-0538

publicación cuatrimestral

enero-abril 2018

vol. 1, no. 2

Revista de Divulgación, Investigación e Innovación

Tequrio

Investigación biomédica

Relevancia biológica de los glicoconjugados

Marcadores genéticos en la caracterización micobacteriana

Biomarcadores para la identificación y determinación del tiempo postcoital

Mecanismos de control neuroinmune y la vía colinérgica antiinflamatoria

El tráfico vesicular y compañía: cambiando perspectivas

Los virus como detonante oncogénico

Cáncer hepático, problema de salud subestimado

Fibrogénesis hepática: células estelares hepáticas

Obra pictórica de
Melisa e Itzel Sánchez Méndez

2

DIRECTORIO

Dr. Eduardo Carlos Bautista Martínez
Rector de la UABJO

Lic. Joaquín Rodríguez González
Secretario Particular

Dr. Taurino Amilcar Sosa Velasco
Secretario Administrativo

M.E. Leticia Eugenia Mendoza Toro
Secretaria General

C.P. Verónica Esther Jiménez Ochoa
Secretaria de Finanzas

Mtro. Javier Martínez Marín
Secretario Académico

Dr. Aristeo Segura Salvador
Secretario de Planeación

COMITÉ CIENTÍFICO

ÁREA I FÍSICO-MATEMÁTICAS Y
CIENCIAS DE LA TIERRA
Dra. Gloria Inés González López
SNI I Área I Universidad Veracruzana

ÁREA II BIOLOGÍA Y QUÍMICA
Dra. Gabriela Mellado Sánchez
SNI I Área II Instituto Politécnico Nacional
Dr. Héctor Manuel Mora Montes
SNI III Área II Universidad de Guanajuato

ÁREA III MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
Dr. Arturo Becerril Vilchis
Asesor del Director de Programas
Complementarios
REPSS Oaxaca, Secretaría de Salud
Dr. Álvaro Muñoz Toscano
SNI II Área III Universidad de Guadalajara
Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana
Universidad Autónoma de
San Luis Potosí

ÁREA IV HUMANIDADES Y
CIENCIAS DE LA CONDUCTA
Dra. Graciela González Juárez
SNI C Área IV Universidad Nacional
Autónoma de México

ÁREA V CIENCIAS SOCIALES Y ECONÓMICAS
Dra. María Eugenia Guadarrama Olivera
SNI I Área V Universidad Veracruzana
Dr. Naú Silverio Niño Gutiérrez
SNI I Área V Universidad Autónoma
de Guerrero
Dra. Mercedes Araceli Ramírez Benítez
Profesora de Tiempo Completo, FES Aragón
Universidad Nacional Autónoma de México

ÁREA VI BIOTECNOLOGÍA Y
CIENCIAS AGROPECUARIAS
Dr. Julián Mario Peña Castro
SNI I Área VI Universidad del Papaloapan
Dr. José Francisco Rivera Benítez
SNI I Área VI Instituto Nacional de
Investigaciones Forestales Agrícolas
y Pecuarias
Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo
SNI III Área VI Centro de Investigaciones
en Alimentación y Desarrollo. A.C.

DIRECTORA EDITORIAL
Dra. Gisela Fuentes Mascorro

COMITÉ EDITORIAL
Dra. María Leticia Briseño Maas
Dra. Rosa María Velázquez Sánchez
Dra. Olga Grijalva Martínez
Dr. Abraham Jahir Ortiz Nahón

COORDINADORA DEL NÚMERO TEMÁTICO
Dra. Gisela Fuentes Mascorro

CORRECCIÓN DE ESTILO, DISEÑO Y MAQUETACIÓN
Servicios editoriales Scriptus
www.scriptus.com.mx

TEQUIO no. 2, enero-abril 2018, es una publicación cuatrimestral editada, impresa y distribuida por la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, con domicilio en Edificio de Rectoría Planta Baja, Secretaría Académica, Dirección de Investigación, Ciudad Universitaria, Avenida Universidades/n, Colonia Cinco Señores, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, C.P. 68120, México. Teléfono 01-951-50-20-700 ext. 20148, Correo electrónico: HYPERLINK "mailto:publicacionesuabjo2016@gmail.com"publicacionesuabjo2016@gmail.com,dirección electrónica:HYPERLINK "http://www.uabjo.mx/publicaciones"www.uabjo.mx/publicaciones. Editora responsable: Dra. Gisela Fuentes Mascorro. Reserva al uso exclusivo **No.04-2017-060616292800-102**, para la versión impresa y **04-2017-070614533300-203**, para la difusión vía red de cómputo, **ISSN: 2594-0538, expedidos por el Instituto Nacional del Derecho de Autor, Certificado de Licitud de Título y Contenido: 16973**, en la **Comisión Calificadora de Publicaciones y Revistas Ilustradas de la Secretaría de Gobernación**. Fecha de impresión: 31 de diciembre de 2017 en la Dirección de Servicios Editoriales, ubicada en el circuito interior de la Ciudad Universitaria. El tiraje consta de veinticinco ejemplares. **TEQUIO** es un espacio para difundir la investigación, las reflexiones teóricas y el conocimiento científico entre la comunidad universitaria y el público en general. Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura de la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca (UABJO).

Contenido

Editorial

Relevancia biológica de los glicoconjugados

Itandehui Belem Gallegos Velasco, Casandra Sosa Amaya,
Luis Miguel García Cruz, Brenda Leticia Santiago Olivera,
Jesús Hernández Juárez y Pedro Antonio Hernández Cruz

5-13

Marcadores genéticos en la caracterización micobacteriana

Perla Mónica Martínez Cruz, Romalda Vásquez Gutiérrez,
María del Pilar Gabriel de la Torre y Lucía Martínez Martínez

15-30

Biomarcadores para la identificación y determinación del tiempo postcoital

Gabriel Mayoral Andrade, Martha Angélica Canseco Lucero,
Eduardo Pérez Campos, Eduardo Pérez-Campos Mayoral
y Laura Pérez-Campos Mayoral

31-34

Mecanismos de control neuroinmune y la vía colinérgica antiinflamatoria

Yobana Pérez Cervera
y Rafael Torres Rosas

35-49

El tráfico vesicular y compañía: cambiando perspectivas

Anayetzin Torres-Rivera

51-55

Los virus como detonante oncogénico

Jael López Martínez, María del Pilar Gabriel de la Torre, Cristian Cruz Ochoa,
Lucía Martínez Martínez y Miguel Ángel Mayoral Chávez

57-67

Cáncer hepático, problema de salud subestimado

Adriana Ramírez-Cosmes, Gabriela Carrasco-Torres, José Fernando Sánchez-Pino,
Irving Martínez-Contreras, Rafael Baltiérrez-Hoyos y Verónica Rocío Vásquez-Garzón

69-77

Fibrogénesis hepática: células estelares hepáticas

Osiris G. Idelfonso García, Alma A. Ramírez Hernández,
Jovito C. Santos Álvarez, Juan M. Velázquez Enríquez,
Gabriela Carrasco Torres, Verónica R. Vásquez Garzón
y Rafael Baltiérrez Hoyos

79-84

Melisa e Itzel Sánchez Méndez:

semilla artística local que florece y da fruto

85



Itzel Sánchez.
"Mayo primaveral",
acrílico sobre tela,
140x200 cm
2017.

Editorial

Fiel al lema de nuestra casa de estudios, "Ciencia, Arte, Libertad", la revista *Tequio* presenta en cada número un tema central que da título a la edición y que de manera sucinta indica al lector lo que encontrará en sus páginas. Los contenidos siempre guardan el carácter científico y surgen de la pluma de profesionales en el área, dando espacio para que estudiantes de posgrado e investigadores titulares expongan la revisión de un tópico de los que constituyen sus líneas de investigación.

Al ser el arte una de las actividades sustantivas de la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca (UABJO), en cada número se incorporan obras pictóricas, presentadas de tal forma que el lector podrá observar una pequeña muestra de la producción de artistas universitarios, hombres y mujeres, vinculados a la UABJO. En esta ocasión se trata de dos catedráticas universitarias, que tienen en común provenir del mismo núcleo familiar.

El número 2 de *Tequio* está dedicado a la investigación biomédica y es una evidencia de la tarea que se lleva a cabo en las facultades de Medicina y Cirugía, Odontología, y Derecho y Ciencias Sociales, a través de los profesores investigadores y de los jóvenes investigadores de las cátedras Conacyt, que se encuentran en la UABJO.

La presente edición inicia con la importancia de los glicanos en procesos fisiológicos y patológicos, para enseguida dar lugar al panorama actual en el diagnóstico de la tuberculosis, enfermedad reemergente a nivel mundial que sigue causando muertes en México. El tercer artículo presenta las técnicas y métodos que buscan precisar el tiempo postcoital, a través del estudio del líquido seminal. En cuarto lugar se aborda la participación de la vía colinérgica una vez activada de manera exógena, para coadyuvar al control no farmacológico de enfermedades inflamatorias. Los siguientes textos abordan diferentes fenómenos que se relacionan con el cáncer, desde el papel que las vesículas y su contenido ostentan, los fenómenos que llevan de una infección viral a la tumorigénesis, los factores de riesgo del cáncer hepático, hasta la actuación de las células estelares en el proceso fibrogénico. Todos los anteriores, temas de crucial relevancia que aportan al desarrollo de nuevos métodos para prevenir o atender padecimientos que parecen caracterizar con mayor énfasis el transcurso del presente siglo.

Comité editorial



Itzel Sánchez.
"Días de fiesta",
acrílico sobre tela
140x120 cm
2017.

RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LOS GLICOCONJUGADOS

BIOLOGICAL RELEVANCE OF THE GLYCONJUGATES

Itandehui Belem Gallegos Velasco, Casandra Sosa Amaya,¹
Luis Miguel García Cruz¹ Brenda Leticia Santiago Olivera,¹
Jesús Hernández Juárez¹ y Pedro Antonio Hernández Cruz^{*1}

Fecha de recepción: 30 de noviembre de 2016

Fecha de aceptación: 31 de octubre de 2017

Resumen - La glicociencia estudia los glicanos, uno de los cuatro tipos de macromoléculas biológicas fundamentales de los seres vivos. Los glicanos son las macromoléculas más abundantes en el planeta; sin embargo, si se comparan con los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos, son los menos estudiados. El análisis de los glicanos es un área de oportunidad para identificar su participación en los principales procesos fisiológicos y patológicos que afectan al ser humano.

Abstract - Glycoscience is a science that studies glycans, one of the four types of fundamental biological macromolecules of living things. Glycans are the most abundant macromolecules on the planet, however, compared to nucleic acids, proteins and lipids, are the least studied. The study of glycans is an area of opportunity to identify their participation in the main physiological and pathological processes that affect the human being.



Palabras clave:

Glicociencia, salud, cáncer.



Keywords:

Glycoscience, health, cancer.

¹ Laboratorio de Glicobiología, Genómica y Proteómica del cáncer. Centro de investigación, Facultad de Medicina UNAM-UABJO.

*Facultad de Medicina UABJO, Oaxaca. Correo electrónico: fuegoblanco136@yahoo.com.mx

Introducción

La información biológica contenida en las estructuras glicánicas es mucho mayor que cualquiera contenida en los otros tipos de macromoléculas. En la superficie de todas nuestras células existe una gran cantidad de glicanos que conforman lo que se conoce como el glicocáliz, el cual es indispensable para establecer procesos de comunicación celular esenciales, particularmente en el contexto de organismos pluricelulares, que incluyen el desarrollo embrionario, los grupos sanguíneos, la adhesión celular, la función de moléculas biológicas solubles como los anticuerpos o la señalización de múltiples receptores celulares (figura 1). Cambios en los procesos biosintéticos de los glicanos pueden provocar diversas enfermedades que afectan al ser humano, incluyendo Alzheimer, cáncer, diabetes y obesidad, así como diversos procesos infecciosos bacterianos o virales donde los glicanos determinan nuestra susceptibilidad a infecciones como el HIV, rotavirus o influenza.

La glicosilación

La glicosilación de proteínas es un evento co-traducciona l que se presenta en el retículo endoplásmico y también un evento terminal que modifica los residuos de azúcar unidos a las proteínas en los diferentes niveles del aparato de Golgi. Este fenómeno desempeña un papel importante en el transporte y destino de las proteínas, a las que se les añaden residuos sacarídicos, pero también se ha observado que tiene importancia por los oligosacáridos que finalmente quedan expresados en la superficie celular (Van den Steen, Rudd, Dwek y Opdenaker, 1998).

Las glicoproteínas son biopolímeros que pueden contener una o más cadenas de carbohidratos unidas al polipéptido. Dichas cadenas se clasifican, de acuerdo con la unión entre el azúcar y el aminoácido, en N- y O-glicanos. Los N-glicanos generalmente presentan una N-acetil-D-glucosamina unida a una asparagina. Los N-glicanos presentes en las proteínas se clasifican en tres grandes grupos: N-glicanos con un

alto contenido de manosa en su estructura, los cuales son muy comunes en proteínas con diversos orígenes y funciones, y son intermediarios para otro tipo de estructuras N-glicánicas más complejas; existen también las estructuras del tipo lactosamínico, cuya característica principal es la presencia de Gal β 1-4GlcNAc en cantidad variable y actúan como señales de reconocimiento celular, ya que las glicoproteínas que presentan este tipo de estructuras normalmente se encuentran en la superficie celular; el tercer tipo de estructura N-glicánica se conoce como híbrida y las proteínas que tienen esta clase de arreglo contienen una mezcla de las estructuras lactosamínicas y de las manosas (figura 2). Los N-glicanos también pueden proteger a las proteínas que los portan de la acción de las proteasas.

Los O-glicanos poseen una N-acetil-D-galactosamina unida a una serina o una treonina de la cadena polipeptídica, a diferencia de los N-glicanos. Los O-glicanos presentan una mayor variedad de estructuras, habiendo ocho secuencias consenso de las cuales deriva el resto de estructuras (figura 3). Por su gran complejidad y diversidad, participan en diversas funciones, por ejemplo, en la conformación de la estructura secundaria y terciaria e inclusive de la cuaternaria de algunas proteínas, como en el caso de las mucinas (Carraway y Hull, 1991); también evitan la agregación de las proteínas (Rose *et al.*, 1984), muchos de los que se encuentran en las glicoproteínas participan activamente en el reconocimiento celular, actuando como ligando (Chapman, Eckart, Kaufman y Lapointe, 1996; Lai, Visser y Poppema, 1991; Powell y Varki, 1994), en la fertilización (Gong, Dubois, Miller y Shur, 1995) y en diversas moléculas que juegan un papel relevante en la regulación de la respuesta inmunológica. En este grupo de células, la O-glicosilación de eipitopes de moléculas extrañas es importante en la interacción de grupos celulares (Nguyen, Knapp y Humpreys, 1993) y en la transducción de señales (Willougby 1993). La presencia de estructuras O-glicánicas anormales -como el antígeno T y Tn y sus formas sialiladas

(figura 3)- en las proteínas, como las mucinas, se ha asociado al desarrollo de tumores (Yamashita, Chung, Horie, Kanagi y Sowa, 1995). Considerando la relevancia de las estructuras oligosacáridicas en las funciones celulares, se han desarrollado diversas técnicas para su estudio y caracterización; una de ellas es el empleo de lectinas, especialmente las provenientes de vegetales, debido a su capacidad para interaccionar y reconocer específicamente secuencias y conformación de las estructuras oligosacáridicas presentes en las glicoproteínas y de acuerdo con esta especificidad se pueden clasificar en lectinas que interactúan con glicanos del tipo N y lectinas que interactúan con glicanos del tipo O. En virtud de la gran complejidad de las estructuras O-glicánicas, las lectinas que interactúan con ellas se subdividen en varios grupos, como se describe en el cuadro 1.

El grado y tipo de glicosilación se halla regulado por un abanico de glicosiltransferasas que actúan secuencialmente en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, sintetizando la unión específica de un monosacárido a un glicano precursor. Por lo tanto, el repertorio de glicosiltransferasas presentes en un determinado tipo celular determina las características particulares de las estructuras de los oligosacáridos que poseen las glicoproteínas de la membrana plasmática y la matriz extracelular (Varki, Cummings, Esko, Freeze, Hart y Marth, 1999). Tomando en cuenta la diversidad y distribución ubicua que poseen los glicoconjugados, resulta sencillo visualizar que estas estructuras median una amplia variedad de efectos biológicos, los cuales en general es posible agrupar en dos tipos: funciones estructurales del glicano en sí mismo o la modulación de la molécula a la que están covalentemente unidos y funciones relacionadas al reconocimiento de la estructura sacarídica por lectinas endógenas, como selectinas y galectinas, o exógenas como las lectinas microbianas (Varki *et al.*, 1999).

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que reconocen de manera específica y reversible carbohidratos en solución o presentes en las

membranas celulares. Lectinas provenientes del reino vegetal han sido empleadas en la investigación biomédica de diferentes formas; así, por ejemplo: la lectina de *Helix pomatia* se ha utilizado en tinciones de histoquímica de adenocarcinoma de pulmón y carcinomas de mama, ya que puede servir como un marcador pronóstico en ambos tejidos; o la lectina *Phaseolus vulgaris*, que fue usada como un factor pronóstico en cáncer de mama y colon, así como en el estudio de los linfomas de células B difusas; la lectina obtenida de *Vicia villosa* con especificidad hacia GalNac, empleada como factor pronóstico en el cáncer de mama; la lectina de *Arachis hypogaeae* específica para el antígeno TF, que ha demostrado funcionar como marcador pronóstico en el cáncer de mama (Dan, Liu y Ng, 2016) y la lectina de *Amaranthus leucocarpus*, que tiene afinidad por los antígenos Tn y TF que se han empleado en el estudio del cáncer cervicouterino y de mama (Aguilar, Pérez-Campos, Solórzano, Pérez, Zenteno y Hernández, 2015).

La glicociencia

La glicociencia es una rama de las ciencias de la vida que estudia la estructura y función de los glicanos, uno de los cuatro tipos de macromoléculas biológicas fundamentales de los seres vivos. Los glicanos son las macromoléculas más abundantes en el planeta; sin embargo, comparativamente con los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos, son los menos estudiados. La disrupción en los procesos que permiten sintetizar adecuadamente los glicanos son un mecanismo fisiopatológico fundamental en distintas enfermedades que afectan al ser humano, incluyendo Alzheimer, cáncer, diabetes y obesidad, así como en diversos procesos infecciosos bacterianos o virales donde los glicanos determinan nuestra susceptibilidad a infecciones como el HIV, rotavirus o influenza. De igual manera, aplicar nuestros conocimientos acerca de los glicanos tiene una gran trascendencia en el desarrollo diagnóstico y terapéutico de diversas enfermedades, a través de la identificación de estructuras glicánicas

aberrantes, particularmente en el cáncer, que sirven para establecer diagnósticos tempranos. Uno de los principales avances y aplicaciones de la glicociencia ha sido en el desarrollo de glicoproteínas recombinantes de uso terapéutico, como la eritropoyetina, o en distintos anticuerpos monoclonales donde los glicanos en estas glicoproteínas definen su estabilidad y/o función efectora.

Los glicocientíficos tienen orígenes disciplinarios distintos; encontramos microbiólogos, bioquímicos, biólogos, químicos, físicos, ingenieros, biotecnólogos, etcétera. La convergencia de dichos orígenes forma la glicociencia, que genera una gran riqueza al abordar los problemas a través de enfoques complementarios y con un mayor éxito para comprender integralmente la función de los glicanos y de los procesos en los que están involucrados.

Impacto de la glicociencia en la salud humana

La glicociencia tiene un impacto en los siguientes aspectos de la salud humana:

Enfermedades crónico-degenerativas

Las enfermedades crónico-degenerativas son padecimientos de larga duración y de progresión lenta, que regularmente están asociadas a la edad, principalmente, y al envejecimiento, pero también existen factores hereditarios que las favorecen como la obesidad. Se ha demostrado que la acción de la α 2-6 sialiltransferasa inhibe la abiogénesis (Kaburagi, Kizuka, Kitazume y Taniguchi, 2016). La hiperglucemia asociada al síndrome metabólico promueve la O-Glucnacilación de proteínas, las cuales pueden participar en la toxicidad derivada de las altas concentraciones de glucosa. Se ha comprobado que la O-Glucnacilación de NF κ B tiene efectos reguladores positivos, favoreciendo la inflamación, pero también tiene efectos reguladores negativos, inhibiendo la acción pro inflamatoria de NF κ B (Baudoin e Issad, 2015). La O-Glucnacilación también participa en el

desarrollo de la nefropatía diabética, a través de la inhibición de la fosforilación de la proteína cina c y del óxido nítrico sintasa (Gellai, Hodrea, Lenart, Hosszu, Koszegi, Balogh, Ver, Banki, Fulop, Molnar, Wagner, Vannay, Szabo y Fekete, 2016).

Cáncer

El cáncer representa un grave problema de salud a nivel mundial. Los que causan un mayor número de muertes anuales son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. Un cambio característico de las células tumorales corresponde a las alteraciones a nivel de la glicosilación. Dichas alteraciones pueden ser muy diversas, como pérdida, aumento o aparición de expresión de estructuras oligosacáridas, o bien la acumulación de precursores. La expresión de estos glicoconjugados no ocurre de manera azarosa, se ha visto que un grupo limitado de oligosacáridos se encuentra frecuentemente enriquecido en la superficie de la célula tumoral. Las modificaciones en la glicosilación pueden favorecer la metástasis, la proliferación no controlada y la inhibición de la apoptosis, funciones clave en el desarrollo del cáncer (Lu y Gu, 2015).

Como consecuencia de la transformación maligna ocurren cambios muy importantes en la glicosilación, sobre todo en la etapa de elongación de los O-glicanos. Esto determina que algunos tipos de núcleos (figura 3), que en las células normales se encuentran enmascarados por la adición de otros azúcares, queden expuestos en la superficie celular, resultando en la formación de nuevos antígenos asociados al cáncer. Los antígenos mejor caracterizados en el cáncer de mama son los Tn [GalNAc((1-O-)Ser/Thr], sialil-Tn [Neu(α 2-6)GalNAc((1-O-)Ser/Thr], T o TF [Gal((1-3)GalNAc((1-O-)Ser/Thr] y sialil-T [Neu(α 2-6)Neu(α 2-3)Gal((1-3)GalNAc((1-O-)Ser/Thr)]. El antígeno Tn es el precursor del antígeno T o TF: por la acción de una β galactosil transferasa, se ha observado que la actividad de la enzima β galactosil transferasa puede estar bloqueada, esto provoca una temprana sialilación

del antígeno Tn, que normalmente se encuentra sustituido con galactosa (Gal) o N-Acetilglucosamina (GlcNAc), lo que permite la formación del esqueleto del oligosacárido y finalmente su terminación con la adición del ácido siálico (NeuAc). La expresión del antígeno sialil-Tn se ha asociado con carcinomas, como por ejemplo, adenocarcinoma gástrico difuso, cáncer de pulmón, cáncer cervicouterino y cáncer de hígado. La expresión de antígenos del tipo Sialil-Lewis se ha relacionado con la capacidad de las células transformadas para invadir otros tejidos y evadir al sistema inmune. Estos O-glicanos algunas veces están unidos a glicoproteínas que pueden ser expresadas en las membranas celulares, lo cual permitiría la búsqueda de nuevos marcadores glicosilados para la detección del cáncer de mama desde sus fases iniciales, en las que los métodos histológicos no logran diferenciar la morfología celular.

La glicociencia ha contribuido a la búsqueda de nuevos blancos que puedan ser utilizados para el desarrollo de métodos diagnósticos más sensibles, específicos y que permitan detectar la enfermedad en etapas tempranas. Por lo anteriormente señalado, un reto para la glicociencia es la implementación de la glicómica como plataforma clínica para el diagnóstico oportuno y la valoración de pacientes oncológicos.

Inmunología

Dentro del área de la inmunología, la descripción de los mecanismos de comunicación intra e intercelular constituye un aspecto clave en la predicción de respuestas biológicas. En ese contexto, la participación de los glicoconjugados constituye una nueva plataforma de regulación de los procesos inmunológicos, por lo cual la vinculación entre la inmunología y las glicociencias se ha establecido de manera prácticamente natural. Así, entonces, resultan áreas de estudio común dentro de la investigación básica la descripción molecular de la adhesión y migración celular, la formación de complejos intermoleculares dinámicos (acción de Galectinas, relación receptor ligando, fagocitosis, activación

celular, sinapsis inmunológica, etcétera), la regulación de la señalización intracelular (glicosilación por O-GlcNAc de fosfoproteínas) y la modulación transcripcional (transactivación de factores de transcripción por Galectinas y estabilización de ARNm). Dentro de los estudios aplicados en la clínica humana y veterinaria, la estabilidad estructural e inmunogenicidad de biofármacos es, sin duda, un aspecto de gran interés entre estos dos campos. Por su parte, los estudios de la relación microbiota-sistema inmune, metabolismo-sistema inmune y la inmunoterapia son áreas de gran interés y donde las glicociencias tienen una participación muy importante, aunque no del todo conocida.

Enfermedades infecciosas

La interacción de un organismo con su entorno abarca muchos aspectos a considerar: el reconocimiento de los factores medioambientales. Sin importar el tipo de patógeno del que se trate (bacteria, hongo, virus o parásito), todos tienen en común el hecho de contar con superficies celulares recubiertas con azúcares conjugados a lípidos (glicolípidos), proteínas (glicoproteínas) y a otros azúcares (polisacáridos) (Chapot-Chartier, 2014). Esta recubierta permite a las células pensar y protegerse de los cambios bruscos del medio ambiente externo, proporciona forma y rigidez a la célula y, en general, posibilita la comunicación intercelular. De manera similar, la superficie de las células del hospedador, junto con el material extracelular, están enriquecidos con moléculas hechas a base de azúcares que hacen posible que se lleven a cabo funciones semejantes a las ya descritas para las células patógenas. Así, no es difícil entender la relevancia de la glicociencia en el campo de las enfermedades infecciosas y en el estudio de los organismos patógenos.

Desórdenes congénitos de la glicosilación

Los desórdenes congénitos de la glicosilación son un grupo de enfermedades metabólicas hereditarias

raras, con una incidencia calculada de < 1:25000. Estos padecimientos son causados por mutaciones en genes involucrados en la síntesis de glicanos; se calcula que aproximadamente 2% del genoma está involucrado en este proceso. Actualmente se tienen identificadas más de cien enfermedades congénitas de la glicosilación, mismas que implican mutaciones en genes que codifican para glicosiltransferasas, glicosidasas, transportadores de glicosilnucleótidos, síntesis de glicosilnucleótidos, síntesis de lípidos y proteínas involucradas en la homeostasis del Golgi. La principal técnica que ha permitido su diagnóstico es el isoelectroenfoque de transferrina sérica, una

N-glicoproteína sería, la cual separa las isoformas de transferrina de acuerdo con su estado de glicosilación y en pacientes con CDG detecta la presencia de isoformas hipoglicosiladas. Posteriormente se ha complementado con el isoelectroenfoque de Apolipoproteína CIII, un marcador sérico de O-glicoproteínas y que junto con el IEF de transferrina permiten identificar a enfermos con afectación mixta de ambas vías de la glicosilación. En Europa y Estados Unidos el análisis del estado de glicosilación de estos marcadores ya se realiza directamente a través de técnicas más sofisticadas, como ESI/MS.

Cuadro 1.

Clasificación de lectinas que poseen especificidad hacia O-glicanos		
OLIGOSACARIDO	LECTINA	GRUPO DE LECTINA
GalNAc	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Leguminosa
Vicia villosa	Leguminosa	
GalNAc α 1-3GalNAc	<i>Amphicarpea bracteata</i>	Leguminosa
Dolichos biflorus	Leguminosa	
Gal β 1-3GalNAc	<i>Arachis hupogaea</i>	Leguminosa
Vicia gramínea	Leguminosa	
<i>Sophora japónica</i>	Leguminosa	
<i>Amaranthus caudatus</i>	Amarantácea	
<i>Amaranthus leucocarpus</i>	Amarantácea	
<i>Artocarpus integrifolia</i>	Moráceas	
GalNAc α 1-3[Fc α 1-2]Gal β 1-3		
GlcNAc	<i>Crotalaria striata</i>	Leguminosa
Falcata japónica	Leguminosa	
Vicia cracca	Leguminosa	

Figura 1.

Importancia de los carbohidratos unidos a glicoproteínas o glicolípidos en las interacciones célula-célula, en la interacción de patógenos como virus y de bacterias con las células.

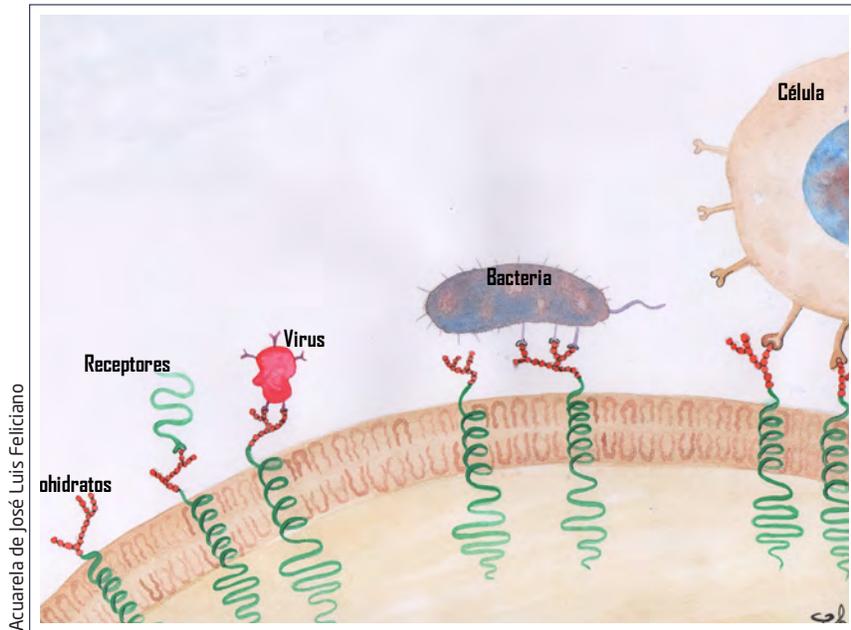
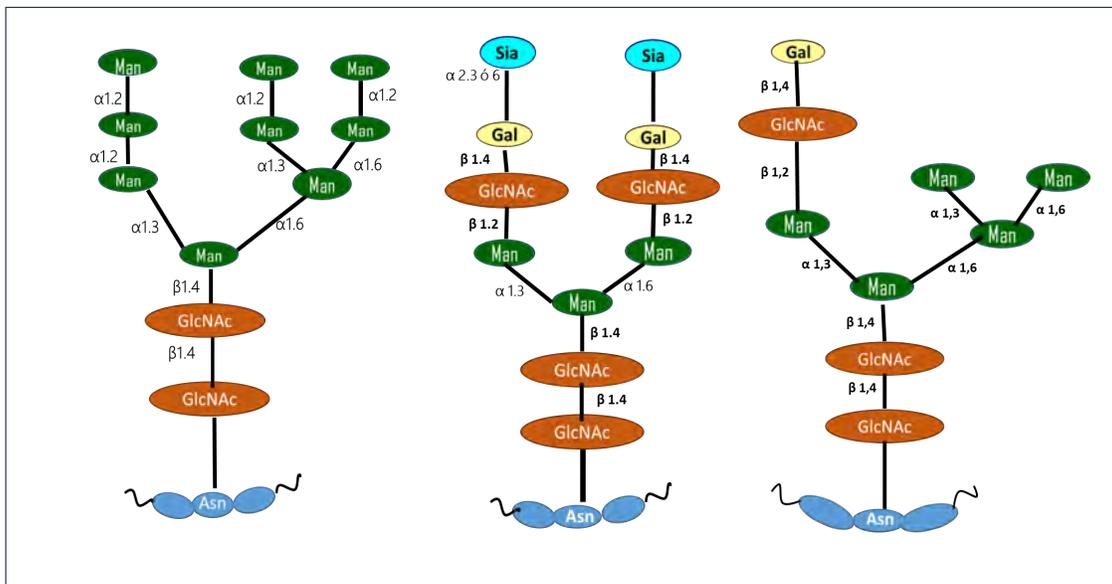


Figura 2.

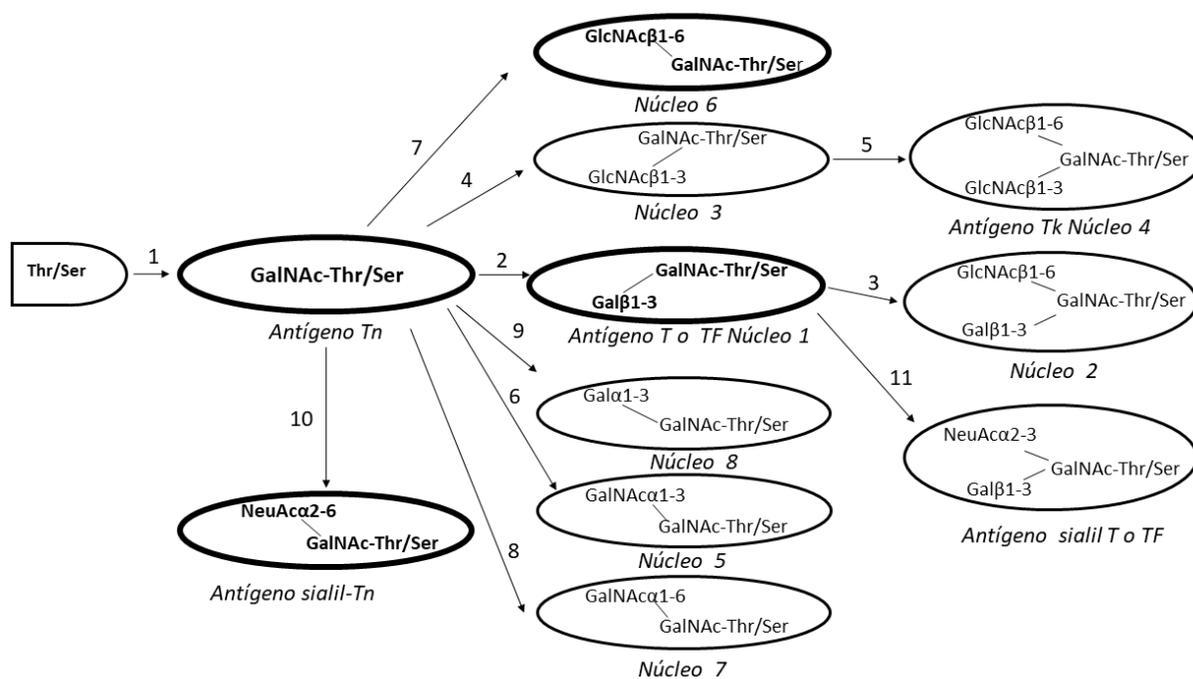
Núcleos sacarídicos internos que corresponden a N-glicanos. Núcleos sacarídicos internos que corresponden a N-glicanos. A) N-glicanos ricos en manosa, B) N-glicanos complejos y C) N-glicanos híbridos.



Sia= Acido siálico. Gal= Galactosa. GalNAc=N-acetilgalactosamina. GlcNAc=N-acetil-glucosamina. Man=Manosa. Ser= Serina. Thr=Treonina. Asn= Asparagina.

Figura 3.

Núcleos sacarídicos internos que corresponden a los ocho núcleos de iniciación de O-glicanos. Estructura y biosíntesis de los núcleos (core) de O-glicanos. Se resalta en borde más oscuro los antígenos mayormente asociados a cáncer de mama que se han identificado. Las enzimas encargadas de la biosíntesis se conocen como glicosiltransferasas, la primera etapa de la O-glicosilación ocurre por la adición de GalNAc a un residuo de Treonina (Thr) o de Serina (Ser) aminoácidos que están en la cadena polipeptídica y que es catalizada por una GalNAc-Transferasa (paso 1); posteriormente dicha estructura se empezara a elongar por la adición de más azúcares que son incorporados a dicha estructura por diferentes glicosiltransferasas, identificándose hasta el momento ocho tipos diferentes de núcleos de O-glicanos cuya formación es de la siguiente manera: núcleo 1 actúa la β 3Gal-Transferasa (paso 2), núcleo 2 actúa la β 6GlcNAc-Transferasa (paso 3), núcleo 3 actúa la β 3GlcNAc-Transferasa (paso 4), núcleo 4 actúa la β 6GlcNAc-Transferasa (paso 5), núcleo 5 actúa la α 3GalNAc-Transferasa (paso 6), núcleo 6 actúa la β 6GlcNAc-Transferasa (paso 7), núcleo 7 actúa la α 6GalNAc-Transferasa (paso 8) y núcleo 8 actúa la α 3Gal-Transferasa (paso 9). Las estructuras sialil-Tn y sialil-TF se forman al ser incorporado ácido siálico a las estructuras de los antígenos Tn y TF, en reacciones catalizadas por la α 2-6-sialil-Transferasa (paso 10) o la α 2-3-sialil-Transferasa (paso 11), respectivamente.



Bibliografía

- Baudoin, L. e Issad, T. (2015). O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Front Endocrinol* 9, 5:235. doi: 10.3389/fendo.2014.00235. Review.
- Chapman B. S., Eckart, M. R., Kaufman, S. E. y Lapointe, G. R. (1996). O-linked oligosaccharide on the 75-kDa neurotrophin receptor. *J. Neurochem*, 66, 1707-1716.
- Chapot-Chartier, M. P. (2014). Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages. *Front Microbiol*, 5, 236. doi: 10.3389/fmicb.2014.00236.
- Carraway, K. L. y Hull, S. R. (1991). Cell surface mucin-type glycoprotein and mucin like domains. *Glycobiology*, 1, 131-138.
- Dan, X., Liu, W. y Ng, T. B. (2016). Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. *Med Res Rev*, 36, 221-47. doi: 10.1002/med.21363.
- Gallegos, B., Aguilar, S., Pérez-Campos, L., Solórzano, C., Pérez, Y., Zenteno, E. y Hernández, P. (2015). Antigen TF and Galectin-3 expression in breast carcinoma. *Journal of Biology and Nature*, 2(2), 37-49.
- Gellai, R., Hodrea, J., Lenart, L., Hosszu, A., Koszegi, S., Balogh, D., Ver, A., Banki, N. F., Fulop, N., Molnar, A., Wagner, L., Vannay, A., Szabo, A. J., Fekete, A. (2016). Role of O-linked N-acetylglucosamine modification in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 311(6), F1172-F1181. doi: 10.1152/ajprenal.00545.2015.
- Gong, X., Dubois, D. H., Miller, D. J. y Shur, B. D. (1995). Activation of a G protein complex by aggregation of beta 1-4galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science*, 269, 1718-1721.
- Kaburagi, T., Kizuka, Y., Kitazume, S., Taniguchi, N. (2016). Inhibitory role of α 2,6-sialylation in adipogenesis. *J Biol Chem*, pii: jbc.M116.747667. doi: 10.1074/jbc.M116.747667.
- Lai, R., Visser, L. y Poppema, S. (1991). Tissue distribution of restricted leucocyte common antigen. A comprehensive study with proteins and carbohydrate-specific CD45R antibodies. *Lab. Invest*, 64, 844-854.
- Lu, J. y Gu, J. (2015). Significance of beta-Galactoside alpha2,6 Sialyltransferase 1 in Cancers. *Molecules*, 20(5), 7509-7527.
- Nguyen, Q. V., Knapp, W., Humpreys, R. E. (1993). Characterization of the invariant chain C-terminus (Glu183-Glu193) epitope which is sylation site at Thr 104 results in generation of a soluble human transferring receptor. *Blood*, 83, 580-586.
- Powell, L. D. y Varki, A. (1994). The oligosaccharide binding specificities of CD22 beta, a sialic acid-specific lectin of B cells. *J. Biol. Chem*, 269, 10628-10636.
- Rose, M. C., Voter, W. A., Sage, H., Brown, C. F. y Kaufman, B. (1984). Effects of deglycosylation on the architecture of ovine submaxillary glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 259: 3167-3172.
- Van den Steen, P., Rudd, M. P., Dwek, A. R. y Opdenaker, G. (1998). Concepts and Principles of O-glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 33, 151-208.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, H., Marth, J. (1999). *Essentials of Glycobiology*, 1st ed. Cold New York: Spring Harbor Laboratory Press.
- Willougby, R. E. (1993). Retroviruses preferentially bind O-linked sialylglycoconjugates and sialomucin. *Glycobiology*, 3, 437-445.
- Yamashita, Y., Chung, Y. S, Horie, R., Kanagi, R. y Sowa, M. (1995). Alterations in gastric mucin with malignant transformation novel pathway for mucin synthesis. *J. Natl. Cancer Inst*, 87, 441-446.



Melisa Sánchez Méndez.
"Serie de peces I",
encausto/tela,
40x40 cm,
2016.

MARCADORES GENÉTICOS EN LA CARACTERIZACIÓN MICOBACTERIANA

GENETIC MARKERS IN THE MYCOBACTERIAL CHARACTERIZATION

Perla Mónica Martínez Cruz,^{1,2} Romalda Vásquez Gutiérrez,¹
María del Pilar Gabriel de la Torre¹ Lucía Martínez Martínez^{1*}

Fecha de recepción: 01 de diciembre de 2016

Fecha de aceptación: 17 de octubre de 2017

Resumen - Los métodos alternativos de identificación provienen del desarrollo de técnicas moleculares basadas en la identificación y análisis de los ácidos nucleicos. Estos métodos han dado un gran impulso a la investigación epidemiológica de la tuberculosis humana, al proporcionar herramientas que permiten identificar, comparar y trazar los patrones genómicos de cepas obtenidas en distintas poblaciones. La presente revisión tiene como objetivo dar un panorama de las posibilidades que hay en materia de diagnóstico e identificación de organismos altamente patógenos, como son las micobacterias, permitiendo de esta manera una mayor rapidez en el establecimiento del tratamiento para disminuir los índices de mortalidad por TB. El presente trabajo se desarrolló a través de compilar información bibliográfica relacionada con el tema, permitiendo correlacionar el resultado de varios autores expertos en la materia.

▼
Palabras clave:

Micobacteria, marcador genético, hsp65, rpoB, 16S rRNA.

Abstract - The alternative methods of taxonomic identification come from the development of molecular techniques based on the identification and analysis of nucleic acids. These methods have given a great impulse to the epidemiological investigation of human tuberculosis by providing tools that allow identifying, to compare and obtain the genomic pattern of strains from different populations. The aim of the present review is to provide an overview of the possibilities for diagnosis and identification of highly pathogenic organisms, such as mycobacteria, thus allowing faster treatment establishment to reduce mortality rates by TB. The present work was developed through the compilation of bibliographical information related to the subject, allowing correlating the information of several expert authors.

▼
Keywords:

Mycobacteria, genetic marker, hsp65, rpoB, 16S rRNA.

¹Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación, Facultad de Medicina UNAM-UABJO.

²División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Oaxaca.
Correo electrónico: lumartin1969@hotmail.com

Introducción

En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la tuberculosis (TB) como una enfermedad reemergente. De acuerdo con datos de la misma organización, la tercera parte de la población mundial se encuentra afectada por este padecimiento. En 2015 se registraron 10.4 millones de casos nuevos, de los cuales 5.9 (56%) son hombres, 3.5 (34%) mujeres y 1.0 (10%) niños; 1.2 (11%) millones del total de dichas incidencias corresponden a personas con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Los países con mayor presencia de TB se localizan en los continentes africano y asiático; en lo que respecta al americano, Brasil es donde se presenta un mayor registro. México pertenece al grupo de países con menor incidencia: 0-24.9 casos por cada 100 000 habitantes (OMS, 2016). En nuestra nación, la TB está ubicada en el número 17 entre las causas de muerte y el primero como causa de muerte por un solo agente infeccioso (Morán Aceves, Peña, Gallegos, Flores M., Montoya, Figuera, Villa y Sánchez, 2000).

El microorganismo causante de la TB es un bacilo Gram positivo, perteneciente al orden *Actinomycetales*, de la familia *Mycobacteriaceae* y género *Mycobacterium*. Aunque, en general, se hace referencia a *Mycobacterium tuberculosis* como el agente etiológico de TB, a la fecha se han descrito nueve especies de este género con la capacidad de infectar al humano, a las que en conjunto se les denomina Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), a éste pertenecen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* y *M. orygis* (Huard, Lazzarini, Butler, Van Soolingen y Ho, 2003).

La vía de diseminación de estos microorganismos es directa, ya que emplean como medio de transporte las gotitas de Pflüger expelidas durante el estornudo o tos del portador. El conducto de entrada es el aparato respiratorio, incubándose -en primer lugar- a nivel pulmonar pudiendo diseminarse y establecerse, posteriormente, en otros órganos, incluyendo el sistema nervioso central. Este mecanismo de infección

se relaciona directamente con el hecho de que entre 80 y 85% de casos de TB sean de tipo pulmonar; otros tipos que se han descrito son meníngea, intestinal, renal, ósea, ganglionar o cutánea (Romero Cabello, 2007).

Es importante mencionar que existen infecciones llamadas micobacteriosis, causadas por micobacterias no tuberculosas, las cuales pueden actuar como patógenos bajo ciertas condiciones (Sauret y Hernández-Flix, 1990), cuya incidencia ha ido en aumento progresivo en pacientes inmunocomprometidos por causas diversas, como desnutrición y, en particular, en aquellos infectados con HIV (Mederos, Rodríguez, Blanco, et al., 2003).

Técnicas de diagnóstico

El diagnóstico de las infecciones micobacterianas se basa en la observación al microscopio de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) con tinción de Ziehl-Neelsen y el aislamiento por cultivo, seguido de identificación bioquímica. La sensibilidad de la baciloscopia varía entre 30 y 80%, depende tanto del aislamiento en cultivo como de los métodos de recuperación utilizados y de la población evaluada (Sommers y McClatchy, 1983); en general, se considera que la baciloscopia tiene un límite de detección del orden de 10³ a 10⁵ microorganismos por mililitro de muestra (Kent y Kubica, 1985). Por otra parte, debido al prolongado tiempo de replicación de las micobacterias, las técnicas de aislamiento basadas en el cultivo requieren de tres a ocho semanas y su sensibilidad (70-90%) es baja cuando se analizan muestras biológicas que contienen un número pequeño de microorganismos (Eisenach, Cave y Crawford, 1993).

La microscopía directa no permite distinguir entre *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y las micobacterias no tuberculosas (MNT), la mayoría de las cuales son resistentes a antifímicos (American Thoracic Society, 1990). La identificación de especies por cultivo requiere, aun empleando métodos radiométricos, de tres a cuatro semanas para obtener el resultado (American Thoracic Society, 2000); identificarlas es

especialmente importante en aquellas regiones en donde la prevalencia de infección por MNT es elevada, como en el noroeste de México (Morán *et al.*, 2000), ya que en enfermedades ocasionadas por ellas se requiere de tratamientos diferentes, por lo tanto, es de suma importancia iniciar un tratamiento específico en forma oportuna y rápida.

Las limitaciones de los métodos tradicionales de laboratorio para la detección e identificación de micobacterias han obligado a implementar nuevas estrategias para disminuir el tiempo necesario para examinar las muestras remitidas al laboratorio clínico.

Las pruebas rápidas y directas que detectan ácidos nucleicos resultan atractivas para el diagnóstico de la TB en laboratorio (Eisenach *et al.*, 1993). Se han utilizado sondas de ácidos nucleicos para localizar micobacterias en cultivo, pero carecen de sensibilidad cuando se utilizan en la detección directa en muestras biológicas (Lebrun, Espinasse, Poveda, Levy-Frebault, 1992), dependiendo del método de extracción del material genético y el tipo de muestra.

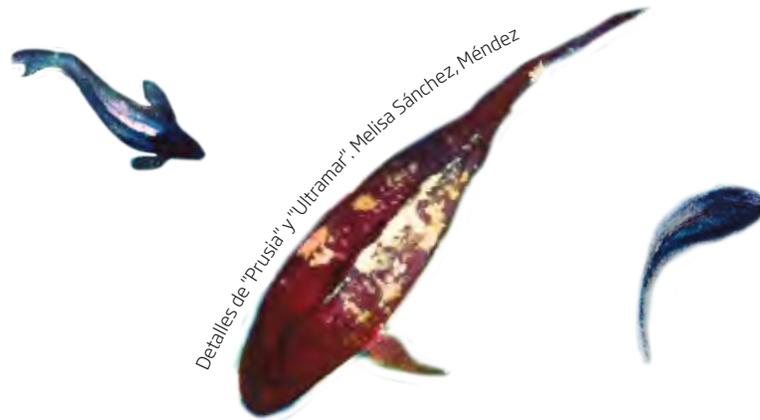
Actualmente, las técnicas moleculares permiten reconocer micobacterias a nivel de especie en aquellas muestras donde los métodos de cultivo y otros procesos convencionales de detección son negativas. Se está haciendo extensivo el uso de procedimientos de amplificación de genes, tanto para la identificación del bacilo tuberculoso a partir de cultivos y muestras clínicas, como para la detección molecular de resistencia a drogas. Así, se tiene la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con gran sensibilidad, que en condiciones óptimas puede detectar de 1 a 10 microorganismos. Con los métodos disponibles de extracción de DNA es posible ahora identificar micobacterias a partir de cualquier muestra biológica (Barrón, Monteghirfo y Rivera, 2006).

La PCR es una técnica de Biología molecular que permite amplificar exponencialmente una secuencia específica de DNA, localizada por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La técnica puede realizarse en tan sólo 24 a 48

horas (Altamirano, Kelly, Wong, Bessuille, Black y Smith, 1992) y es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de DNA micobacteriano en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de TB y con resultados negativos en la tinción de Ziehl-Neelsen o el cultivo, lo cual resulta particularmente útil en infecciones no bacilíferas y en enfermos con cuadros atípicos asociados con la infección por el HIV o con la inmunosupresión por trasplante (Popper, Winter y Höfler, 1994; Saboor, Johnson y McFadden, 1992). La amplificación de secuencias específicas de DNA micobacteriano mediante PCR se ha realizado a partir de cultivos y directamente de muestras biológicas (Cormican, Barry, Gannon, Flynn, 1992; Nolte, Metchock, McGowan, Edwards, Okwumabua, Thurmond, Plikaytis y Shinnick, 1993).

Genoma de *Mycobacterium tuberculosis*

Anteriormente se consideró que el genoma de Mtb era estable y carecía de polimorfismos. Estudios realizados a mediados de la década de 1990 mostraron el descubrimiento de sitios monomórficos y polimórficos en el genoma de la bacteria, que se puede dividir posiblemente en tres grupos, llamados polimorfismo de nucleótido sencillo (del inglés SNPs), polimorfismo de secuencia extensa (LSPs) y polimorfismo de secuencias repetitivas. Cuando este último fue sometido a una caracterización posterior, se revelaron dos clases de DNA: 1) Elementos de DNA transponibles o repeticiones dispersas, tales como secuencias de inserción (IS) y 2) Repeticiones cortas en tándem; éstas se clasifican, a su vez, en repeticiones polimórficas en tándem (MPTR), las cuales son básicamente múltiples repeticiones de 10 pares de bases (pb) que se separan por unidades intercaladas de 5 pb y se encuentran en diferentes posiciones en el genoma de Mtb, y repeticiones cortas en tándem (STR), conteniendo 49 repeticiones de 36 pb cada una, separadas por secuencias cortas de DNA de 41 pb, llamado DNA espaciador (Desikan y Narayanan, 2015).



En 1998, Cole *et al.* publicaron la secuencia completa del genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, conformado por alrededor de 4.5 millones de pares de bases, rico en G-C (65.6%), y en el que abunda el DNA repetitivo, particularmente en secuencias de inserción, nuevas familias multigénicas y genes housekeeping duplicados. Muchas de las secuencias de inserción se localizan en regiones intergénicas o no codificantes (Cole *et al.*, 1998). Este conocimiento permitió su comparación con las secuencias correspondientes al resto de las especies del CMTB, concluyendo que existe una elevada homología entre ellos, independientemente de sus características bioquímicas o fenotípicas (Huard *et al.*, 2003). La homología de los genomas de las especies del CMTB permite el uso de ciertas regiones como marcadores genéticos en la identificación molecular en un probable caso de TB.

Marcadores genéticos

IS6110

La técnica de PCR IS6110 es la que presenta mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *Mtb*. El IS6110 es un elemento genético de inserción que genéricamente se denomina IS, del inglés *insertion sequence*; éste representa secuencias de DNA

dispersas en los genomas bacterianos con actividad de transposición. La secuencia IS6110 sólo es detectable en genomas bacterianos del complejo *Mtb* y tiene la estabilidad necesaria para ser utilizada como herramienta de diagnóstico (Barrón *et al.*, 2006).

El IS6110 -descrito por primera vez por Thierry, Cave, Eisenach, Crawford, Bates, Gicquel y Guesdon- es un elemento de inserción micobacteriano que se ha utilizado sistemáticamente como marcador genético para la tipificación de especies de *Mtb* (Thierry *et al.*, 1990), originalmente descubierto en especies de *Escherichia coli* y *Shigella* (Desikan y Narayanan, 2015).

Las secuencias de inserción son secuencias repetidas útiles en la evolución genética de los microorganismos (Nghiem, Nguyen, Nguyen, Bich y Nong, 2015). El análisis del genoma de *Mtb* generó el hallazgo de 16 copias de la IS6110, seis copias correspondientes a IS1081, así como 32 secuencias de inserción distintas, algunas de las cuales pertenecen a las familias IS3 e IS256 (Cole *et al.*, 1998). El IS6110 es un fragmento de 1355 pb que se encuentra inserto en un arreglo de 36 pb, denominado regiones repetidas directas (DR) (Roychowdhury, Mandal y Bhattacharya, 2015).

Las secuencias de inserción son elementos inestables en el genoma de *Mycobacterium*, lo que queda demostrado por el número variable de copias

encontrado en las distintas cepas del microorganismo. Lo anterior ha llevado a proponer la clasificación de las cepas de Mtb como de "alto número de copias" cuando presentan más de siete de estas secuencias repetidas y de "bajo número de copias" al presentar una cantidad menor a siete (Roychowdhury *et al.*, 2015). La secuenciación del genoma de cepas identificadas en regiones específicas confirma la presencia de tales repeticiones, aunque en número variable (Park, Kang, Yoo, Lee, Roh, Kim, Ryooa, 2014; Millán-Lou, Otal, Monforte, Vitoria, Revillo, Martín y Samper, 2015; Feyisa, Haeili, Zahednamazi Mosavari, Taheri, Hamzehloo, Zamani y Feizabadi, 2016).

Es importante mencionar que IS6110 es una secuencia exclusiva de las especies que forman el complejo *M. tuberculosis* (CMTB), por lo que puede ser empleada como un marcador específico para distinguir a las especies del complejo en métodos de diagnóstico (Sposito Campanerut, Ghiraldi, Leite, Hirata, Hirata, Siqueira y Fressatti, 2014; Sinha *et al.*, 2016; Roychowdhury *et al.*, 2015). Por otro lado, IS1081 ha sido empleada para ayudar en la diferenciación de cepas de *M. bovis* (Nghiem *et al.*, 2015).

El polimorfismo que presenta esta secuencia ha sido empleado para identificar las distintas cepas del CMTB que se han descrito hasta la actualidad. La variabilidad de IS6110 se aprovecha para la genotipificación de Mtb mediante el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) (Zaczek, Brzostek, Wojtasik, Dziadek y Sajduda, 2013; Phyu, Wah, Jong, Go-Eun y Chulhun, 2016; Nghiem *et al.*, 2015). Los patrones de restricción obtenidos del análisis del material genético de las cepas aisladas de un sitio en particular se pueden comparar con una base de datos ya existente, la cual es administrada por el Instituto Pasteur.¹ De esta forma es posible saber si la cepa examinada ya fue identificada previamente; en caso contrario, puede ingresarse el nuevo patrón de restricción correspondiente a una nueva cepa encontrada. Estudios epidemiológicos emplean esta comparación para determinar la presencia o no de

cepas específicas en países o ciudades (Zheng, Zhao, Zhu, Li, Sun, Feng, *et al.*, 2014).

Dada la variabilidad que pueden presentar estas secuencias de inserción, se ha propuesto que la modificación en el patrón de restricción de una cepa particular se relaciona con su evolución; de esta forma, se plantea que la organización de estas secuencias varía no sólo con el tiempo, sino también con el estadio o fase de la infección. Se ha calculado que aproximadamente cada 3.2 años ocurre un cambio en el patrón de restricción, en tanto que se ha sugerido que durante la fase inicial de la infección ocurre con mayor frecuencia una variación en la secuencia, más que en los estadios más avanzados (Phyu *et al.*, 2016). Se ha sugerido que entre más alto es el número de copias de IS6110 presente en la cepa, más se eleva la capacidad de generar ventajas evolutivas como resistencia a drogas, virulencia y eficiencia en la transmisión (Zheng *et al.*, 2014; Roychowdhury *et al.*, 2015). Tal es el caso de la cepa Beijing, conocida por ser de las más resistentes; se han descrito hasta 21 copias de esta secuencia en su genoma (Zheng *et al.*, 2014).

Aunque IS6110 ha sido por muchos años un buen indicador de la presencia de cepas de Mtb, tiene una limitante, y es que aquellos microorganismos cuyo genoma presenta menos de seis copias de la secuencia de inserción son difíciles de analizar mediante RFLP, ya que no se observan los fragmentos de restricción esperados, por lo que el análisis debe complementarse con otros métodos, como Unidades Repetitivas Intercaladas micobacteriana-Número Variable de Repeticiones en Tándem (MIRU-VNTR, por sus siglas en inglés) o DR (Zheng *et al.*, 2014). Por otro lado, la identificación con IS6110 es suficiente para genotipificar una cepa, lo que no ocurre con las MIRU-VNTR. Se ha observado que, en general, hay una discrepancia entre los resultados, siendo IS6110 el más confiable (Zheng *et al.*, 2014; Jonsson, Hoffner, Berggren, Bruchfeld, Ghebremichael, Pennhag y Groenheit, 2014; Gholoobi Masoudi, Meshkat y Meshkat, 2014; Brossier, Sola, Millot, Jarlier, Veziris

¹pasteur_guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/

y Sougakoffa, 2014). Thabet, Karboul, Dekhil y Mardassi propusieron una nueva técnica basada en la amplificación de IS6110 mediante PCR, con la cual es posible amplificar tanto el extremo 3' como 5' de estas secuencias, con lo que se facilita la identificación de polimorfismos en la secuencia de inserción (Thabet et al., 2014).

Gen rpoB

El rpoB es un gen unicopia de 723 pb que contiene cuatro regiones conservadas y tres regiones variables (Kim, Lee, Lyu, Kim, Bai, Kim, Chae, Kim, Cha y Kook, 1999). Se encuentran polimorfismos en su secuencia, especialmente en el codón 531, el cual se ha asociado con la resistencia a la rifampicina. Kim et al., 1999, obtuvieron la secuencia completa del gen rpoB en 44 especies de micobacterias. Al amplificar un fragmento de 306 pb, localizado en una región muy conservada del gen, determinaron que las especies pertenecientes al CMTB presentaron secuencias idénticas, en tanto que otros aislados mostraron 93.1% de homología con especies de micobacterias no patógenas. Este resultado demostró que rpoB es un marcador específico de identificación para las especies que conforman el CMTB (Kim et al., 1999).

En seguimiento al estudio sobre rpoB, este mismo equipo publicó en 2004 el resultado de la amplificación mediante PCR dúplex de dos fragmentos específicos de este gen para micobacterias tuberculosas y no tuberculosas, de 235 pb y 136 pb, respectivamente. La publicación muestra la presencia de uno solo de estos fragmentos en cada caso, según el grupo al que pertenezca la especie evaluada (Kim, Hong, Lee, Yun, Kim, Park, Bai y Kook, 2004). Con esto se demostró que rpoB contiene secuencias muy conservadas entre todas las especies de Mycobacterium, pero que al mismo tiempo incluye secuencias específicas que permiten identificar las especies que conforman el CMTB, aun en aislados clínicos.

Por otro lado, se ha empleado rpoB -junto con otros genes como hsp65 y 16S rRNA- para detectar especies

de micobacterias, especialmente las del CMTB (Huang, Chen, Hu, Chiou, Huang, Hsu, Lu y Shen, 2012), así como en el diagnóstico diferencial de especies del complejo *M. avium* (Kim, Shin, Lee y Koh, 2013; Jang, Koh, Huh, Kim, Jeon, Ki y Lee, 2014).

En 2003, Adékambi y Drancourt reportaron el uso de la secuencia total de rpoB para identificar especies de Mycobacterium de crecimiento rápido, pertenecientes a los grupos *Mycobacterium chelonae-abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium smegmatis*, las cuales provocan padecimientos de las vías aéreas, piel y órganos blandos, por lo que su correcta caracterización favorece la administración del tratamiento, al conocerse su susceptibilidad a los antibióticos.

Recientemente se le ha utilizado, junto con hsp65, en la identificación de especies no tuberculosas de micobacterias (Phelippeau Aboubaker, Musso y Drancourt, 2015; Gingeras, Ghandour, Wang, Berno, Small, Drobniewski, Alland, Desmond, Holodniy y Drenkow, 1998; Nie, Duan, Huang, Lu y Chu, 2015). Incluso se ha logrado reconocer nuevas especies de micobacterias o la incorporación de algunas ya existentes en la filogenia de este género.

Gen gyrB

El gyrB es un gen de 2028 pb que codifica para la subunidad β de la DNA girasa (topoisomerasa II), una enzima distribuida universalmente y esencial para la replicación bacteriana. Al igual que rpoB, la secuencia de gyrB es muy conservada entre las especies del CMTB, la homología es prácticamente de 100%, existiendo en ciertas ocasiones diferencias de un solo nucleótido entre algunas especies. Lo anterior fue demostrado al amplificar mediante PCR un fragmento de 1020 pb sobre DNA proveniente de cultivos de especies de micobacterias no tuberculosas y tuberculosas, observándose la amplificación únicamente en este último grupo bacteriano. Resultados similares se obtuvieron de aislados a partir de muestras clínicas de pacientes diagnosticados con TB (Kasai, Ezaki y

Harayama, 2000; Niemann, Harmsen, Sch-Gerdes y Richter, 2000), lo que no deja duda de la utilidad de *gyrB* en la determinación de la presencia de especies del CMTB.

Tras la amplificación del fragmento de 1020 pb, Kasai, Niemann y sus colegas investigadores examinaron los patrones de restricción obtenidos con *RsaI* y *TaqI* para las especies pertenecientes al CMTB y aquellas que no se encuentran en este grupo. Observaron el mismo patrón de bandas para aquellas del CMTB, lo que les llevó a ratificar la homología de esta secuencia entre las especies y a concluir que serían indistinguibles por este medio. Sin embargo, Chimara, Ferrazoli y Leao reportaron observar patrones de restricción distintos para el CMTB, al efectuar una mejor separación mediante electroforesis de los fragmentos obtenidos tras la restricción con las mismas enzimas. Utilizando el software GelComparII identificaron la presencia de un número mayor de fragmentos con patrones distintos para cada especie, resultados que les permitieron proponer su metodología como un medio efectivo para reconocer las especies pertenecientes al CMTB a través de *gyrB* (Chimara et al., 2004).

El procedimiento antes descrito ya ha sido empleado con éxito en la determinación del agente causal de casos de TB; por ejemplo, en Alemania se identificó a *M. caprae* como responsable de TB meníngea en humanos. El análisis del patrón de restricción obtenido sobre el producto de la amplificación del fragmento de 1020 pb de *gyrB*, previamente usado por Niemann, Kasai y Chimara, permitió, en primer lugar, descartar la presencia de un miembro del CMTB y, posteriormente, ubicar a la especie responsable del caso (Hansena, Seilera, Rumpfa, Krafta, Dlaskea, Abele-Hornb y Muellges, 2012).

Este conocimiento se ha aplicado no sólo al diagnóstico en humanos, sino también en animales. En Italia se ha dado seguimiento a la prevalencia de TB entre jabalíes, que originalmente se atribuía a *M. bovis*. Sin embargo, el estudio realizado en 2014 empleando la técnica arriba descrita develó que existe un nuevo

agente causal en esta población: *M. microti* (Boniotti, Gaffuri, Gelmetti, Tagliabue, Chiari, Mangeli, et al., 2014).

Gen *hsp65*

El gen *hsp65* está constituido por 1380 pb y su secuencia es muy conservada entre las especies de *Mycobacterium* (tuberculosas y no tuberculosas), lo que se ha confirmado mediante la amplificación del gen por PCR empleando los mismos oligonucleótidos. No obstante, los patrones de restricción obtenidos para esta secuencia son diversos para las especies no tuberculosas, en tanto que las pertenecientes al CMTB generan los mismos fragmentos de restricción (Plikaytis, Plikaytis, Yakrus, Butler, Woodley, Silcox, y Shinnick, 1992; Telenti, Marchesi, Balz, Bally, Botrger y Bodmer, 1993; Ringuet, Akoua-Koffi, Honore, Varnerot, Vincent, Berche, Gailard y Pierre-Audigier, 1999). Esta evidencia permite considerar a *hsp65* como un buen marcador de identificación de especies del CMTB, así como un elemento útil en el diagnóstico de padecimientos provocados por especies no pertenecientes a él.

Se ha observado que la secuenciación de este gen permite distinguir entre especies del género *Mycobacterium* en 99.1%. Dai, Chen y Lauzardo comunicaron la creación de una base de datos de acceso público que contiene información filogenética para identificar especies del género *Mycobacterium* a partir del gen *hsp65*. En esta base de datos se incluye 99.3% de todas las especies de *Mycobacterium* (Dai et al., 2011).

En el GeneBank de los institutos nacionales de Salud de Estados Unidos se encuentran registradas las secuencias de *hsp65* de especies no pertenecientes al CMTB, por ejemplo *M. marinum*, *M. haemophilum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. avium*. Conocerlas facilita el diagnóstico de infecciones causadas por alguna de estas especies y, con ello, la determinación y administración del tratamiento correcto (Lau, Curreem, Ngan, Yeung, Yuen y Woo, 2011; Mendes, Magdinier, Cardoso, Pais, Cezar, Dias, 2013; Gunaydin, Yanik, Eroglu, Sanic, Ceyhan, Erturan y Durmas, 2013; Hoza, Mfinanga, Rodloff, Moser y König, 2016).

La importancia del conocimiento de la secuencia de hsp65 es tal, que se torna indispensable contemplarla entre los genes principales que describen e identifican a las especies de micobacterias junto con otros genes como rpoB y 16S rRNA, por citar algunos (Dias, De Souza, Ohnishi, Watanabe, Ohtsuka, Matsushima *et al.*, 2012). Estudios en los que se emplea el análisis de restricción de estos tres genes han demostrado 100% de concordancia en la identificación de Mtb (Huang *et al.*, 2012).

Kim *et al.*, (1999) han demostrado la efectividad del gen hsp65 en la identificación de diversas cepas de Mycobacterium a partir de muestras clínicas en las que existen múltiples especies bacterianas. Las técnicas empleadas han sido PCR dúplex, análisis de restricción y PCR en tiempo real, confirmando en todos los casos la utilidad de hsp65 para determinar la presencia de miembros del CMTB y de otras especies de micobacterias (Mun, Kim, Oh, Kim, Park, Bai, Do, Cha, Kook y Kim, 2007; Kim, Park, Lee, Kim, Cha, Kook, Kim, Joo, Lee y Jim, 2008; Kim, Lee, Lee, Shim, Lim *et al.*, 2010). Otro estudio que apoya la especificidad de la secuencia de hsp65 en especies de micobacterias es el reportado por Varma, Garima, Pathak, Dhar, Narang, Bhatnagar y Bose, quienes lograron la amplificación de 300 pb de este gen, únicamente en cepas micobacterianas y no en otras especies bacterianas (Varma *et al.*, 2013).

Recientemente se ha incrementado el número de casos de infecciones provocadas por micobacterias pertenecientes al complejo *M. avium*, lo que ha motivado la generación de métodos de diagnóstico eficaces. Hay reportes de varios países en los que ya se están probando metodologías que comprenden la secuenciación, amplificación o restricción de hsp65, solo o en junto con otros genes, como parte de este diagnóstico diferencial (Bensi, Panunto y Ramos, 2013; Kim *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2013; Macente, Fujimura Barreto, Dias, Cosmo, Rodrigues, Hiroyuki, Dominguez y Fressatti, 2013; Jang *et al.*, 2014).

Gen 16S rRNA ribosomal (16S) y Región Intergénica 16S-23S (ITS)

La comparación de la secuencia de los genes ribosomales (rRNA) es una poderosa herramienta para deducir las relaciones filogenéticas y evolutivas entre bacterias, archaeobacterias y organismos eucarióticos. Estas secuencias se han obtenido por métodos que incluyen oligonucleótidos, secuenciación de clonas, secuenciación directa del RNA usando transcriptasa reversa y secuenciación de material amplificado por PCR.

La taxonomía basada en el gen 16S rRNA es la más ampliamente usada y comprendida hoy en día, pero todavía no ha alcanzado su máximo potencial porque numerosos microorganismos pertenecen a taxones que aún no han sido caracterizados; además, múltiples secuencias que podrían ser clasificadas aún permanecen sin ser incluidas (McDonald, Price, Goodrich, Nawrocki, De Santis, Probst, Andersen, Knight y Hugenholtz, 2012).

Varios genes ribosomales (rRNA) y espaciadores transcritos internos (ITS) se han utilizado en la identificación bacteriana basada en PCR, tales como 16S, 23S rRNA, 5S rRNA y SSU rRNA (Olsen, Lane, Giovannoni, Pace y Stahl, 1986; Ree y Zimmermann, 1990). La identificación basada en PCR utiliza los genes ribosomales, ya que juegan un papel importante en el organismo vivo y tienen estabilidad funcional a lo largo de la evolución, debido a la rara variación en sus secuencias a través de millones de años, lo cual los hace ideales para ser utilizados en identificación y propósitos taxonómicos (Awad, Ouda, El-Refy, El-Feky, Mosa y Helmy, 2015).

Numerosos genes ribosomales, ITS, hsp65, rpoB, gyrB, groEL y recA han sido probados como marcadores en identificación bacteriana (Case, Boucher, Dahllöf, Holmström, Doolittle y Kjelleberg, 2007). Sin embargo, el 16S rRNA es el gen ribosomal más ampliamente usado en la identificación bacteriana, debido a varias razones: está presente en casi todas las familias bacterianas, tiene estabilidad funcional y evolutiva,

su longitud es alrededor de 1500:1550 pb, la cual es suficiente para propósitos taxonómicos y conveniente para la amplificación; asimismo, este gen contiene regiones conservadas y regiones variables, y en muchos casos la bacteria presenta múltiples copias en su genoma y a veces diferencias de secuencias que pueden ser utilizadas para distinguir especies cercanamente relacionadas (Han, 2006; Block y Ouellette, 2012).

Las micobacterias, por ejemplo, se pueden clasificar como de crecimiento rápido (<7 días) o de crecimiento lento (> 7 días) (García-Agudo y García-Martos, 2011). Las primeras comúnmente tienen dos copias idénticas de los genes 16S rRNA, mientras que las segundas sólo presentan una copia (Reischl, Feldmann, Naumann, Gaugler, Ninet, Hirschel y Emler, 1998).

La región ITS ha mostrado particular utilidad en la asignación taxonómica de micobacterias, debido a que es mucho menos conservada en comparación con el gen 16S rRNA y muestra potencial para producir más alto grado de polimorfismo genético (Gray, Kong, Jelfs, Sintchenko y Chen, 2014).

Regiones de diferenciación (RD)

Los genomas de las especies que conforman el CMTB comparten una homología de 99.9%. Estudios de comparación genómica han identificado más de 140 genes cuya presencia es facultativa y que podrían conferir diferencias en fenotipo y virulencia entre las especies del CMTB. Muchos de estos genes se localizan en las denominadas regiones de diferencia (RD) cromosomales (Gordon, Brosch, Billault, Garnier, Eiglmeier y Cole, 1999; Pym, Brodin, Brosch, Huerre y Cole, 2002), de las cuales se describieron inicialmente 16 (RD1-RD16), cifra que ha aumentado hasta 68 (Behr, Wilson, Gill, Salamon, Schoolnik, Rane y Small, 1999; Sharifipour Farnia, Mozafari, Irani y Velayati, 2016). El análisis de las secuencias genómicas de *M. tuberculosis*, *M. microti* y *M. bovis* ha confirmado la delección de algunas de estas regiones polimórficas en las últimas dos especies como un mecanismo de

variabilidad genética entre los miembros del CMTB (Mostowy, Onipede, Gagneux, Niemann, Kremer, Desmond, et al., 2004).

Al ser las regiones de mayor polimorfismo en el CMTB, se les ha propuesto como marcadores genéticos en la identificación de las especies del complejo y, más aún, en la identificación de subgrupos dentro de cada especie. Por ejemplo, Mostowy et al. resumen en su publicación diversos reportes que identifican tres grupos de *M. africanum* en función de las RD: el grupo 1, en el que RD7, RD8, RD9 y RD10 se encuentran presentes; el grupo 2, en el que RD9 se encuentra deletada, en tanto que el resto de las RD están presentes; y el grupo 3, en que las cuatro RD en mención se encuentran ausentes (Mostowy et al., 2004). Dos años más tarde, Warren et al. demostraron que mediante PCR multiplex y empleando las RD1, RD4, RD9 y RD12 era posible diferenciar entre *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG, estableciendo patrones de amplificación para cada caso. *M. tuberculosis* tiene a las cuatro RD estudiadas, *M. canettii* carece de RD12, *M. caprae* no cuenta con RD9, *M. bovis* sólo presenta RD1 y *M. bovis* BCG no muestra ninguna de las cuatro RD (Warren et al., 2006). Estos reportes indican que las RD pudieran emplearse como buenos marcadores genéticos en la diferenciación de las especies del CMTB.

Por otro lado, pese a que no se ha dilucidado la función de estas regiones para el bacilo, se les ha asociado fuertemente con el grado de virulencia que presenta cada especie del CMTB. El caso específico de RD1 (9.8 kb) ha llamado la atención, ya que se ha descrito su ausencia en cepas empleadas como vacuna contra TB, elaboradas a partir de *M. bovis* BCG y *M. microti* (Pym et al., 2002; Parkash, Singh y Pai, 2009; Kim, 2013). Por su parte, Lewis, Liao, Guinn, Hickey, Smith, Behr y Sherman probaron que la delección de RD1 en H37Rv disminuyó considerablemente su virulencia al infectar monocitos y macrófagos, sugiriendo el papel de RD1 en la regulación de genes esenciales para la virulencia del bacilo (Lewis et

al., 2003). Posteriormente, se reportó una mutación en RD2 relacionada con una atenuación mayor en la cepa empleada para vacunación, lo que fue probado por Kozak, Alexander, Liao, Sherman y Behr, al realizar experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando la cepa H37Rv a la que se había deletado RD2 (Kozak *et al.*, 2011). La relación que se ha establecido entre las RD y la virulencia de las cepas de CMTB ha llevado a considerarlos como blancos de vacunas contra TB.

También se ha sugerido el empleo de las RD en el diagnóstico de TB, específicamente para asegurar que se está identificando a un miembro del CMTB como agente causal y no a *M. bovis* BCG (Behr *et al.*, 1999). El grupo de Wang en 2011 sugirió el uso de RD2 y RD11 para este fin, por su capacidad para inducir la respuesta inmune.

Conclusiones

La homología de los genomas de las especies del CMTB permite el uso de ciertas regiones como marcadores genéticos en la identificación de la micobacteria en un probable caso de TB, con lo que posibilita un diagnóstico más rápido y preciso de la enfermedad, además de que contribuye al pronto tratamiento.

Los marcadores genéticos como los abordados en la presente revisión han sido de gran utilidad en la identificación micobacteriana a nivel mundial, específicamente para reconocer a las especies dado su nivel de conservación entre ellas dentro de este complejo micobacteriano.

Las RD evidencian que son responsables de la variabilidad entre los genomas de las especies del CMTB y que a pesar de representar un pequeño porcentaje del genoma, pudieran tener un papel muy importante en la identidad de cada una de las especies de este complejo. Aunque no se ha determinado su función y su importancia en la biología del bacilo, los resultados muestran que son relevantes en la virulencia de cada especie.

Aún no hay un único gen blanco que indique ser suficientemente discriminatorio para la determinación

de especies en todas las micobacterias de rápido crecimiento, de lento crecimiento y las no tuberculosas.

La habilidad de diferentes tecnologías para distinguir con cierta precisión especies cercanamente relacionadas se mantiene incierta, pero la metodología y herramientas moleculares están permitiendo coadyuvar en las técnicas fenotípicas para determinar la posición taxonómica de las distintas especies de micobacterias, sobre todo las de interés en salud pública.

Lo anterior nos lleva a proponer más estudios para determinar la diversidad, así como el análisis filogenético de los aislados dentro de estas poblaciones, mediante la obtención de secuencias de distintos marcadores genéticos, ya que están aumentando las infecciones por micobacterias atípicas; es decir, micobacterias no tuberculosas.

Bibliografía

Adékambi, T., Colson, P. y Drancourt, M. (2003). rpoB-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 41(12), 5699-5708.

Altamirano, M., Kelly, M.T., Wong, A., Bessuille, E. T., Black, W.A., Smith, J. A. (1992). Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30(8), 2173-2176.

Dunlap N., E., Bass, J., Fujiwara, P., Hopewell, P., Horsburgh C., R., Salfinger, M., Simone, P. M. (2000). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(4), 1376-1395.

Awad, M., Ouda, O., El-Refy, A., El-Feky, F. A., Mosa, K. A. y Helmy, M. (2015). FN-Identify: Novel Restriction Enzymes-Based Method for Bacterial Identification in Absence of Genome Sequencing. *Advances in Bioinformatics*, 1-14.

- Barrón, H., Monteghirfo, M., Rivera, N. (2006). Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. *An Fac Med Lima*, 67(1), 11-18.
- Bensi E., P., Panunto P., C. y Ramos M. C. (2013). Incidence of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria, differentiated by multiplex PCR, in clinical specimens of a large general hospital. *Clinics*, 68(2), 179-183.
- Behr M., A, Wilson M., A., Gill W., P., Salamon, H., Schoolnik, G. K., Rane, S. y Small, P. M. (1999). Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science* 284(5419), 1520-1523.
- Block M., G. y Oullette, A. (2012). Genetic identification of eleven aquatic bacteria using the 16S rDNA gene. *J Res Across Disc.*, 1-46.
- Boniotti M., B., Gaffuri, A., Gelmetti, D., Tagliabue, S., Chiari, M., Mangeli, A., et al. (2014). Detection and Molecular Characterization of *Mycobacterium microti* Isolates in Wild Boar from Northern Italy. *J Clin Microbiol*, 52(8), 2834-2843.
- Brossier, F., Sola, C., Millot, G., Jarlier, V., Veziris, N. y Sougakoffa, W. (2014). Comparison of a Semiautomated Commercial Repetitive-SequenceBased PCR Method with Spoligotyping, 24-Locus Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing, and Restriction Fragment Length Polymorphism-Based Analysis of IS6110 for *Mycobacterium tuberculosis* Typing. *J Clin Microbiol*, 52(11), 4082-4086.
- Case R., J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F. y Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microb*, 73(1), 278-288.
- Chimara, E., Ferrazoli, L. y Leao S., C. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* Complex Differentiation Using gyrB Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(7), 745-748.
- Cole S., T., Brosch, J., Parkhill, T., Garnier, C., Churcher, D., Harris S., V., Gordon, et al. (1998). Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the Complete Genome Sequence. *Nature*, 393(6685), 537-544.
- Cormican M., G., Barry, T., Gannon, F. y Flynn, J. (1992). Use of polymerase chain reaction for early identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive cultures. *J Clin Pathol*, (45), 601-604.
- Dai, J., Chen, Y. y Lauzardo, M. (2011). Web-Accessible Database of hsp65 Sequences from *Mycobacterium* Reference Strains. *J Clin Microbiol*, 49(6), 2296-2303.
- Desikan, S. y Narayanan, S. (2015). Genetic markers, genotyping methods & next generation sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res* (141), 761-774.
- Dias C., C., De Souza C., P., Ohnishi, H., Watanabe, T., Ohtsuka, K., Matsushima, S., et al. (2012). First Isolation of *Mycobacterium kyorinense* from Clinical Specimens in Brazil. *J Clin Microbiol*, 50(7), 2477-2478.
- Eisenach K., D., Cave M., D. y Crawford J., T. (1993). PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. En Persing D., H., Smith, F., Tenover, C. y White, J. (eds.), *Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications* (pp. 191-196). Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Feyisa S., G., Haeili, M., Zahednamazi Mosavari, N., Taheri M., M., Hamzehloo, G., Zamani, S. y Feizabadi M., M. (2016). Molecular characterization of

- Mycobacterium tuberculosis* isolates from Tehran, Iran by restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *Rev Soc Bras Med Trop*, 49(2), 204-210.
- García-Agudo, L. y García-Martos, P. (2011). Clinical significance and antimicrobial susceptibility of rapidly growing mycobacteria. *Sci Against Microb Pathog Commun Curr Res Technol Adv.*, 363-377.
- Gholoobi, A., Masoudi-Kazemabad, A., Meshkat, M. y Meshkat, Z. (2014). Comparison of Culture and PCR Methods for Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* in Different Clinical Specimens. *Jundishapur J Microbiol*, 7(2), e 8939.
- Gingeras T., R., Ghandour, G., Wang, E., Berno, A., Small P., M., Drobniewski, F., Alland, D., Desmond, E., Holodniy, M. y Drenkow, J. (1998). Simultaneous Genotyping and Species Identification Using Hybridization Pattern Recognition Analysis of Generic *Mycobacterium* DNA Arrays. *Genome Research*, 435-448.
- Gordon S., V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K. y Cole, S. T. (1999). Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microb*, 32(3), 643-655.
- Gray T. J., Kong, F., Jelfs, P., Sintchenko, V. y Chen A., C. (2014). Improved identification of Rapidly Growing Mycobacteria by a 16S.23S Internal Transcribed Spacer Region PCR and Capillary Gel Electrophoresis. *PLoS ONE*, 9(7), 1-8.
- Gunaydin, M., Yanik, K., Eroglu, C., Sanic, A., Ceyhan, I., Erturan, Z. y Durmas, R. (2013). Distribution of Nontuberculous Mycobacteria strains. *Ann of Clin Microb Antimicrob*, (12), 33.
- Han X., Y. (2006). Bacterial Identification Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequence Analysis. En *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (pp. 323-332). NY: Springer.
- Hansena, N., Seilera, C., Rumpfa, J., Krafta, P., Dlaskea, H., Abele-Hornb y Muellges, W. (2012). Human Tuberculous Meningitis Caused by *Mycobacterium caprae*. *Case Rep Neurol*, (4), 54-60.
- Hoza A. S., Mfinanga S., G., Rodloff A., C., Moser, I. y König, B. (2016). Increased isolation of nontuberculous mycobacteria among TB suspects in Northeastern, Tanzania: public health and diagnostic implications for control programmes. *BMC Res Notes*, 9, 109.
- Huang C., C., Chen, J. H., Hu, S. T., Chiou C., S., Huang, W. C., Hsu, J. Y., Lu, J. J. y Shen, G. (2012). Combined rpoB duplex PCR and hsp65 PCR restriction fragment length polymorphism with capillary electrophoresis as an effective algorithm for identification of Mycobacterial species from clinical isolates. *BMC Microbiology*, (12), 137.
- Huard R. C., Lazzarini, L. C., Butler, W. R., Van Soolingen, D. y Ho, J. L. (2003). PCR-Based Method to Differentiate the Subspecies of the Mycobacterium tuberculosis Complex on the Basis of Genomic Deletions. *J Clin Microbiol*, 41(4), 1637-1650.
- Jang, M. A., Koh, W. J., Huh H., J., Kim S., Y., Jeon, K., Ki C., S. y Lee N., Y. (2014). Distribution of Nontuberculous Mycobacteria by Multigene Sequence Based Typing and Clinical Significance of Isolated Strains. *J Clin Microbiol*, 52(4), 1207-1212.
- Jonsson, J., Hoffner, S., Berggren, I., Bruchfeld, J., Ghebremichael, S., Pennhag, A. y Groenheit, R. (2014). Comparison between RFLP and MIRU-VNTR Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Stockholm 2009 to 2011. *PLoS ONE*, 9(4), e 95159.

- Kasai, H., Ezaki, T. y Harayama, S. (2000). Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria by Their gyrB Sequences. *J Clin Microbiol*, 38(1), 301-308.
- Kent, P. T. y Kubica, G. P. (1985). *Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory*. Atlanta: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control.
- Kim B., J., Lee S., H., Lyu M., A., Kim S., J., Bai G., H., Kim S., J., Chae, G., T., Kim E., C., Cha, Y. y Kook, Y. (1999). Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (rpoB). *J. Clinical Microbiology*, 37(6), 1714-1720.
- Kim B., J., Hong S., K., Lee K., H., Yun Y., J., Kim E., C., Park Y., G., Bai G., H. y Kook Y., H. (2004). Differential Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Nontuberculous Mycobacteria by Duplex PCR Assay Using the RNA Polymerase Gene (rpoB). *J Clin Microbiol*, 42(3), 1308-1312.
- Kim B., J., Park J., H., Lee S., A., Kim, H., Cha C., Y., Kook Y., H., Kim, E., Joo, S., Lee, J. y Jim, J. (2008). Differentiation of Mycobacteria in Sputa by Duplex Polymerase Chain Reaction for Mycobacterial hsp65 Gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, (62), 193-198.
- Kim, K., Lee, H., Lee M., K., Lee S., A., Shim T., S., Lim S., Y. et al. (2010). Development and Application of Multiprobe Real-Time PCR Method Targeting the hsp65 Gene for Differentiation of Mycobacterium Species from Isolates and Sputum Specimens. *J Clin Microbiol*, 48(9), 3073-3080.
- Kim S., Y., Shin S., J., Lee N., Y. y Koh W., J. (2013). First Case of Pulmonary Disease Caused by a *Mycobacterium avium* Complex Strain of Presumed Veterinary Origin in an Adult Human Patient. *J Clin Microbiol*, 51(6), 1993-1995.
- Kim, Y., Choi, Y., Jeon B., Y., Jin, H., Cho, S. y Lee, H. (2003). A Simple and Efficient Multiplex PCR Assay for the Identification of Mycobacterium Genus and *Mycobacterium tuberculosis* Complex to the Species Level. *Yonsei Med J.*, 54(5), 1220-1226.
- Kozak R., A., Alexander D., C., Liao, R., Sherman D., R. y Behr M., A. (2011). Region of Difference 2 Contributes to Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 79(1), 59-66.
- Lau S., K., Curreem S., O., Ngan A., H., Yeung C., K., Yuen K., Y. y Woo P., C. (2011). First Report of Disseminated Mycobacterium Skin Infections in Two Liver Transplant Recipients and Rapid Diagnosis by hsp65 Gene Sequencing. *J Clin Microbiol*, 49(11), 3733-3738.
- Lebrun, L., Espinasse, F., Poveda, J. D., Levy-Frebault, V. V. (1992). Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of Mycobacteria. *J Clin Microbiol*, (30), 2476-2478.
- Lewis K., N., Liao, R., Guinn, K., M., Hickey M., J., Smith, S., Behr, M. y Sherman D., R. (2003). Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* Mimics Bacille Calmette-Guérin Attenuation. *J Infect Dis.*, 187(1), 117-123.
- Macente, S., Fujimura L., C., Barreto S., A., Dias S., V., Cosmo M., L., Rodrigues M., N., Hiroyuki, M., Dominguez C., R. y Fressatti C., R. (2013). Evaluation of hsp65 Nested PCR-Restriction Analysis (PRA) for Diagnosing Tuberculosis in a High Burden Country. *BioMed Research International*, 1-6.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., De Santis, T. Z., Probst, A., Andersen, G., Knight,

- R., y Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, (6), 610-618.
- Millán-Lou, M. I., Otal, I., Monforte, M. L., Vitoria, M. A., Revillo, M. J., Martín, C. y Samper S. (2015). In vivo IS6110 profile changes in a *Mycobacterium tuberculosis* strain as determined by tracking over 14 years. *J Clin Microbiol*, (53), 2359 -2361.
- Mederos C., L. M., Rodríguez D., F., Blanco, G. F. et al. (2003). Micobacteriosis diseminada asociada al complejo *Mycobacterium avium*-intracellulare (MAI) en paciente infectado con el virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Cubana Med Trop*, 55(2), 126-128.
- Mendes C., A., Magdinier G., H., Cardoso O., M., Pais R., J., Cezar C., P., Dias C., C. E., et al. (2013). Nontuberculous mycobacteria in respiratory samples from patients with pulmonary tuberculosis in the state of Rondônia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(4), 457-462.
- Morán M., M. C., Aceves, H. D., Peña, M. P. M., Gallegos A., M. P., Flores M., S. E., Montoya, F. H., Figuera, L., Villa Manzanares, L. y Sánchez, J. (2000). Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. *Rev Panam Salud Pública*, 7(6), 389-394.
- Mostowy, S., Onipede, A., Gagneux, S., Niemann, S., Kremer, K., Desmond E., P. et al, (2004). Genomic Analysis Distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol*, 42(8), 3594-3599.
- Mun H., S., Kim H., J., Oh E., J., Kim, H., Park Y., G., Bai G., H., Do, J., Cha C., Y., Kook, Y. y Kim, B. (2007). Direct application of Avall PCR restriction fragment length polymorphism analysis (Avall PRA) targeting 644 bp heat shock protein 65 (hsp65) gene to sputum samples. *Microbiol Immunol* (51), 105-110.
- Nghiem M., N., Nguyen B., V., Nguyen S., T., Bich V., T. T y Nong, H. V. (2015). A simple, Single Triplex PCR of IS6110, IS1081, and 23S Ribosomal DNA Targets, Developed for Rapid Detection and Discrimination of *Mycobacterium* from Clinical Samples. *J Microbiol Biotechnol*, 25(5), 745-752.
- Nie, W., Duan, H., Huang, H., Lu, Y. y Chu, N. (2015). Species Identification and Clarithromycin Susceptibility Testing of 278 Clinical Nontuberculosis *Mycobacteria* isolates. *BioMed Research International*, 1-7.
- Niemann, S., Harmsen, D., Sch-Gerdes, S. R. y Richter, E. (2000). Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by *gyrB* DNA Sequence Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol*, 38(9), 3231-3234.
- Nolte, F. S., Metchock, B., McGowan, J. E., Edwards, A., Okwumabua, O., Thurmond, C., Plikaytis, B. y Shinnick, T. (1993). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hibridization. *J Clin Microbiol* (31), 1777-1782.
- Olsen G., J., Lane D., J., Giovannoni S., J., Pace, N. R. y Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann Rev Microbiol*, (40), 337-365.
- Organización Mundial de la Salud. *Global tuberculosis report 2016*.
- Park, Y. K., Kang, H., Yoo, H., Lee, S. H., Roh, H., Kim, H. J., Ryooa, S. (2014). Whole-Genome Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Korean Strain KIT87190. *Genome Announ*, 2(5), 01103-14.

- Parkash, O., Singh B., P. y Pai M. (2009). Regions of Differences Encoded Antigens as Targets for Immunodiagnosis of Tuberculosis in Humans Scandinavian. *J Immunol*, (70), 345-357.
- Phelippeau, M., Aboubaker, O. D., Musso, D. y Drancourt, M. (2015). Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in French Polynesia. *J Clin Microbiol*, (53), 3798-3804.
- Phyu, W. E., Wah, W. A., Jong, S. L., Go-Eun, C., Chulhun, L. C. (2016). Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: A Review of Frequently Used Methods. *J Korean Med Sci* (31), 1673-1683.
- Plikaytis, B. B., Plikaytis, B. D., Yakrus, M. A., Butler, W. R., Woodley, C. L., Silcox, V. A. y Shinnick, T. M. (1992). Differentiation of Slowly Growing Mycobacterium Species, Including *Mycobacterium tuberculosis*, by Gene Amplification and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol*, 30(7), 1815-1822.
- Popper, H. H., Winter, E. y Höfler, G. (1994). DNA of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol*, (101), 738-741.
- Pym A., S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. y Cole, S. T. (2002). Loss of RD1 Contributed to the Attenuation of the Live Tuberculosis Vaccines *Mycobacterium Bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*, 46(3), 709-717.
- Ree H. K. y Zimmermann, R. A. (1990). Organization and expression of the 16S, 23S and 5S ribosomal RNA genes from the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Nucleic Acids Reseach*, 18(15), 4471-4478.
- Reischl, U., Feldmann, K., Naumann, L., Gaugler B., J., Ninet, B., Hirschel, B., Emler, S. (1998). 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*, (36), 1761-1764.
- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gailard, J. L. y Pierre-Audigier, C. (1999). hsp65 Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 37(3), 852-857.
- Romero C., R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. 3ª edición. México: Editorial Medicapanamericana.
- Roychowdhury, T., Mandal, S. y Bhattacharya, A. (2015). Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*, (5), 12567.
- Saboor, S. A., Johnson, N. M. y McFadden, J. (1992). Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet*, 339(8800), 1012-1015.
- Sharifipour, E., Farnia, P., Mozafari, M., Irani, S. y Velayati A., A. (2016). Deletion of region of difference 181 in *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains. *International J Mycobacteriology*, (5), 238-5239.
- Sauret, J. y Hernández-Flix, S. (1990). Tratamiento actual de las micobacteriosis. *Med Clín.*, 95(2), 64-66.
- Sinha, P., Gupta A, Prakash P, Anupurba S, Tripathi R, Srivastava, G. N. (2016). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32kD alpha antigen encoding gene fragments. *BMC Infectious Diseases*, (16),123.

Sommers, H. M. y McClatchy, J. K. (1983). *Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses*. Washington, D. C.: Am Soc for Microbiol.

Sposito F., L. E., Campanerut P., A. Z., Ghiraldi, L. D., Leite, C. Q. F, Hirata, M. H., Hirata R., D. C., Siqueira, V. y Fressatti, R. (2014). Multiplex-PCR for differentiation of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Braz J Microbiol*, 45(3), 841-843.

Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Botrger, E. C. y Bodmer, T. (1993). Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *J Microbiol*, 31(2), 175-178.

Thabet, S., Karboul, A., Dekhil, N. y Mardassi, H. (2014). IS6110-50 30 FP: an automated typing approach for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains simultaneously targeting and resolving IS6110 50 and 30 polymorphisms. *Intl J Infec Dis* (29), 211-218.

Thierry, D., Cave, M. D., Eisenach, K. D., Crawford, J. T., Bates, J. H., Gicquel, B., Guesdon, J. L. (1990). IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nuc Acids Res*, 18(1), 188.

Varma-Basil, M., Garima, K., Pathak, R., Dhar, D. S., Narang, A., Bhatnagar, A. y Bose, M. (2013). Development of a Novel PCR Restriction Analysis of the hsp65 Gene as a Rapid Method to Screen for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Nontuberculous Mycobacteria in High-Burden Countries. *J Clin Microbiol* 51(4), 1165-1170.

Wang, S., Chen, J., Zhang, Y., Diao, N., Zhang, S., Wu, J. y Zhang, W. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* Region of Difference (RD) 2 Antigen Rv1985c and RD11 Antigen Rv3425 Have the Promising Potential

to Distinguish Patients with Active Tuberculosis from *M. bovis* BCG-Vaccinated Individuals. *Clin Vacc Immunol: CVI*, 20(1), 69-76.

Wallace, R. Jr, O'Brien, R., Glassroth, J., Raleigh, J. y Dutt, A. (1990). Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*, 142(4), 940-953.

Warren, R. M., Gey van Pittius, N. C., Barnard, M., Hesselning, A., Engelke, E., De Kock, M., Gutiérrez, M. C., Chege, G. K., Victor, T. C., Hoal, E. G., Van Helden, P. D. (2006). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis*, 10(7), 818-822.

Żaczek, A., Brzostek, A., Wojtasik, A., Dziadek, J. y Sajduda, A. (2013). Genotyping of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Based on IS6110 and MIRU-VNTR Polymorphisms. *BioMed Research International*, ID 865197. doi:10.1155/2013/865197

Zheng, C., Zhao, Y., Zhu, G., Li, S., Sun, H., Feng, Q., et al. (2014). Differentiating Spoligotyped Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Sichuan in China. *BioMed Research International*, ID 763204.



BIOMARCADORES PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL TIEMPO POSTCOITAL

BIOMARKERS FOR THE IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF POST-COITAL TIME

Gabriel Mayoral Andrade,^{1,4} Martha Angélica Canseco Lucero,^{2,1}
Eduardo Pérez Campos,³ Eduardo Pérez-Campos Mayoral⁴ y
Laura Pérez-Campos Mayoral⁴

Fecha de recepción: 14 noviembre 2016

Fecha de aceptación: 26 noviembre 2017

Resumen - La consumación del acto sexual no deseado o violación es un problema de salud pública en el país. La búsqueda de espermatozoides en la vagina o en la ropa mediante microscopía, determinación de la fosfatasa ácida, búsqueda del antígeno prostático y análisis genéticos son algunas de las pruebas para confirmar una violación. Sin embargo, el lavado de las zonas genitales, la labilidad de las moléculas que se miden, la cantidad insuficiente de material biológico y el elevado costo de algunas pruebas impiden confirmar la agresión, por lo que identificar muestras biológicas o manchas presuntivas de líquido seminal es de suma importancia. Es posible localizar material biológico mediante microscopía de luz, determinación de la fosfatasa ácida, cromatografías, búsqueda de antígeno prostático y análisis genéticos. En esta revisión se pretende agrupar y examinar las principales metodologías para tal propósito.



Palabras clave:

Biomarcadores, líquido seminal.

Abstract - The consummation of the unwanted sexual act or rape is a public health problem in the country. The search for sperm in the vagina or clothing by microscopy, the determination of acid phosphatase, the search for the prosthetic antigen and genetic tests are some of the tests to confirm a violation. However, the washing of the genital areas, the lability of the molecules that are measured, the insufficient amount of biological material and the high cost of some tests, prevent confirming the aggression, so identifying biological samples or presumptive spots of seminal fluid is of the utmost importance. The search for biological material in case of violation can be done by light microscopy, determination of acid phosphatase, chromatography, prosthetic antigen search and genetic analysis. This review aims to group and examine the main methodologies for this purpose.



Keywords:

Biomarkers, seminal fluid.

¹ Facultad de Derecho y Ciencias Sociales UABJO.

² Laboratorio de Patología Clínica "Dr. Eduardo Pérez Ortega".

³ Instituto Tecnológico de Oaxaca.

⁴ Centro de Investigación en Ciencias Médicas y Biológicas, Facultad de Medicina UABJO.

Correo electrónico: laurapcm@prodigy.net.mx

Introducción

Las pruebas para determinar el tiempo postcoital e identificar muestras de semen son limitadas e influenciadas por las acciones que realice la víctima posterior al abuso sexual, como la limpieza de los genitales.

La mayoría de las pruebas utilizadas para identificar líquido seminal presentan, además, la limitante de indicar únicamente si la mancha o el líquido se trata de plasma seminal, pero ninguna de las técnicas o métodos actualmente empleados arroja con exactitud el tiempo aproximado desde la consumación del acto sexual. En este trabajo se realiza una compilación de biomarcadores y técnicas usadas para identificar y determinar dicho tiempo.

Marco teórico

La agresión sexual es un problema de salud pública y atenta contra los derechos humanos. Las mujeres se enfrentan al riesgo de sufrir una violación cuatro veces más que los hombres, en países desarrollados. En México se encontró una prevalencia de 4.6%, no habiendo diferencia estadísticamente significativa en el sexo (Ramos, Saldívar, Medina Rojas y Villatoro, 1998). La edad más frecuente del abuso sexual está entre los 16 y 24 años.

El tipo de victimización corresponde, en orden de frecuencia, a violación, abuso sexual, tentativa de violación y estupro (Khachatryan, Heide, Hummel y Chan, 2014). La detección en muestras biológicas o manchas presuntivas de líquido seminal y su diferenciación de otros fluidos corporales es de suma importancia para confirmar el abuso sexual o en casos de violación (Stefanidou, Alevisopoulos y Spiliopoulou, 2010; Watanabe, Akutsu, Takamura y Sakurada, 2016). Algunas pruebas con que contamos hoy en día son las siguientes.

Microscopía

Las manchas obtenidas en prendas o mucosa vaginal se pueden utilizar para el diagnóstico confirmatorio de

líquido seminal por medio de microscopía, con el objeto de buscar espermatozoides; pero, aunque es altamente específica, es poco sensible. Cuando el líquido seminal es depositado en la vagina, la posibilidad de encontrar espermatozoides depende de que se haya realizado o no limpieza del área genital. Su duración aproximada en el canal endocervical es de 114 horas, en el fondo del saco vaginal de 120 horas, en el rectal de 65 horas, anal de 46 horas y en la boca aproximadamente de seis horas (Christian, Lavelle, De Jong, Loiselle, Brenner y Joffe, 2000).

Fosfatasa ácida

La fosfatasa ácida es una enzima secretada por la glándula prostática; aunque también se puede encontrar en otros fluidos, en ninguno es tan alto como en la secreción prostática. Por ello se ha utilizado como prueba presuntiva de presencia de semen y la identificación del antígeno prostático específico como señal confirmatoria.

El principio de detección se basa en que la fosfatasa ácida cataliza en medio ácido la hidrólisis del alfa-naftil fosfato, que da como resultado alfa-naftol, el cual reacciona con una sal de diazonio (Fast Red, TR), formando un cromógeno púrpura. La cuantificación de fosfatasa ácida es más sensible para detectar líquido seminal que la búsqueda de espermatozoides (Schumann, Badawy, Peglow y Henry, 1976), incluso puede ser un indicador del tiempo aproximado del coito (Findley, 1977).

El lapso promedio en que desaparece la fosfatasa ácida en muestras vaginales varía en diversos estudios realizados y va de 14 horas, hasta otros que indican que se encuentra después de 30 días posterior al coito (Memchoubi, Supriya, Shaini, Sangeeta, Gyaneshwar y Bijoy, 2006).

Antígeno prostático específico

El antígeno prostático específico (PSA) es una glicoproteína de la familia serino proteasas, también conocido como antígeno p30. Es producido por la

glándula prostática y secretado en el líquido seminal, se ha utilizado como biomarcador para demostrar la presencia de fluido seminal (Budowle, Rudin, Gehrig, Borer, Thali y Dirnhofer, 1999). Es posible encontrarlo hasta 27 horas posteriores al acto sexual.

Enzimas y anticuerpos

En algunos estudios se ha realizado la identificación de enzimas y anticuerpos por medio de anticuerpos contra la enzima fucosiltransferasa, presente únicamente en el acrosoma de los espermatozoides. Así se han diferenciado espermatozoides del líquido seminal de fluidos vaginales, orina, saliva u otros líquidos corporales con una alta especificidad (Li, Zhou, Zhu, Cui, Wang, Ding y Pang, 2012).

Igualmente, se ha identificado por medio de anticuerpos contra semenogelina mediante inmunocromatografía, que es una proteína generada en las vesículas seminales, lo que ha resultado tan confiable para localizar líquido seminal como el PSA (Pang y Cheung, 2007).

El antígeno específico de vesículas seminales (SVSA) es otra proteína que, aunque tiene una cierta especificidad, tiene reacción cruzada con algunas proteínas presentes en el fluido vaginal (Chen y Hortin, 2000). En otros trabajos se han expuesto los varios intentos de diferenciar las células vaginales de otros tipos, en especial de las presentes en el líquido espermático mediante inmunohistoquímica, pero han ofrecido muchas limitantes tanto en su especificidad como en la complejidad para realizar el estudio (Fleming y Harbison, 2010).

Fluorogenos

Algunas investigaciones han propuesto reconocer el líquido seminal mediante sustratos fluorogénicos (μ -HSSKLQ-AFC) para el antígeno prostático específico, a fin de detectar y visualizar *in situ* líquido seminal, al mismo tiempo que no afecta la integridad del material genético (Gooch, Daniel y Frascione, 2014).

Cromatografía líquida de alta resolución y espectrofotometría

Como se mencionó anteriormente, las pruebas en las que la identificación del líquido seminal se realiza a través de enzimas y anticuerpos -a pesar de resultados prometedores- tienen sus restricciones debido a la reactividad cruzada que muestran con diferentes fluidos corporales. Por ello se ha propuesto el fraccionamiento proteómico mediante HPLC y espectrofotometría de masas de proteínas que diferencien las proteínas presentes en el líquido seminal de otras localizadas en otros fluidos corporales (Legg, Powell, Reisdorph, Reisdorph y Danielson, 2014; Van Steendam, De Ceuleneer, Dhaenens, Van Hoofstat y Deforce, 2013).

Biología molecular

Es posible analizar el DNA en las muestras recolectadas de semen mediante reacción de cadena de la polimerasa (PCR) o por patrones de fragmentos de restricción (RFLPs). Utilizando RT-PCR múltiple ha sido factible por medio de RNA mensajero el o los genes de origen de muestras biológicas con gran precisión (Zhu, Wang y Zhang, 2013), por lo que se concluye que las diversas moléculas utilizadas como biomarcadores para identificar líquido seminal son diversas; la mayoría de ellas son complejas y para su realización requieren centros especializados, además de que no precisan el tiempo postcoital, por lo que se necesita estudiar otros biomarcadores que pudieran brindar con mayor precisión este dato.

Bibliografía

Budowle, B., Rudin, O., Gehrig, C., Borer, U., Thali, M. y Dirnhofer, R. (1999). Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. *Hochmeister. J Forensic Sci.*, 44(5), 1057-1060.

Chen, J. T. y Hortin, G. L. (2000). Interferences with semen detection by an immunoassay for a seminal

- vesicle-specific antigen. *J Forensic Sci.*, 45(1), 234-235.
- Christian, C. W., Lavelle, J. M., De Jong, A. R., Loisselle, J., Brenner, L., y Joffe, M. (2000). Forensic Evidence Findings in Prepubertal Victims of Sexual Assault. *Pediatrics*, 106. doi: 10.1542/peds.106.1.100
- Findley, T. P. (1977). Quantitation of vaginal acid phosphatase and its relationship to time of coitus. *Am J Clin Pathol*, 68(2), 238-242.
- Fleming, R. I. y Harbison, S. (2010). The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Sci Int Genet*, 4(4), 244-256.
- Gooch, J., Daniel, B. y Frascione, N. (2014). Application of fluorescent substrates to the *in situ* detection of prostate specific antigen. *Talanta* 125, 210-214. doi: 10.1016
- Khachatryan, N., Heide, K. M., Hummel, E. V. y Chan, H. C. (2014). Juvenile Sexual Homicide Offenders: Thirty-Year Follow-Up Investigation. *Int J Offender Ther Comp Criminol*. doi: 10.1177/0306624X14552062.
- Legg, K. M., Powell, R., Reisdorph, N., Reisdorph, R. y Danielson, P. B. (2014). Highly Specific Protein Markers for the Identification of Biological Stains. *Electrophoresis*. doi: 10.1002
- Li, F. R., Zhou, Y. S., Zhu, L. H., Cui, H. G., Wang, B. J., Ding, M. y Pang, H. (2012). Distribution specificity of human fucosyltransferase 5 and its expression and localization in spermatids. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 28(2), 112-4, 119.
- Memchoubi, Ph., Supriya, K., Shaini, L., Sangeeta, N., Gyaneshwar, V. y Bijoy, S. (2006). Study of Acid Phosphatase Activity in Post Coital Subjects. *JIAFM*, 28(1), 18-19.
- Pang, B. C. y Cheung, B. K. (2007). Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen. *Forensic Sci Int*. 169(1), 27-31.
- Ramos Lira, L., Saldívar Hernández, G., Medina Mora, M. E., Rojas Guiot, E. y Villatoro
- Stefanidou, M., Alevisopoulos, G. y Spiliopoulou, C. (2010). Fundamental issues in forensic semen detection. *West Indian Med J.*, 59(3), 280-283.
- Schumann, G. B., Badawy, S., Peglow, A. y Henry, J. B. (1976). Prostatic acid phosphatase. Current assessment in vaginal fluid of alleged rape victims. *Am J Clin Pathol*, 66(6), 944-952.
- Van Steendam, K., De Ceuleneer, M., Dhaenens, M., Van Hoofstat, D. y Deforce, D. (2013). Mass spectrometry-based proteomics as a tool to identify biological matrices in forensic science. *Int J Legal Med.*, 127(2), 287-298.
- Velázquez, J. (1998). Prevalencia de abuso sexual en estudiantes y su relación con el consumo de drogas. *Salud Pública*, 40, 221-233.
- Watanabe, K., Akutsu, T., Takamura, A. y Sakurada, K. (2016). Evaluation of a blood-specific DNA methylated region and allele-specific blood identification from mixed body fluid DNA. *Leg Med*, 22, 49-53.
- Zhu, Y. Y., Wang, C. y Zhang, C. N. (2013). MicroRNAs in seminal plasma: an update. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 19(11), 1039-1042.

MECANISMOS DE CONTROL NEUROINMUNE Y LA VÍA COLINÉRGICA ANTIINFLAMATORIA

NEURAL CONTROL OF IMMUNITY AND THE CHOLINERGIC ANTI-INFLAMMATORY PATHWAY

Yobana Pérez Cervera¹ y Rafael Torres Rosas²

Fecha de recepción: 28 de noviembre 2016

Fecha de aceptación: 3 de diciembre 2017

Resumen - El sistema inmune innato es la primera línea de defensa involucrada en proteger contra agentes patógenos externos y es esencial para la supervivencia. Sin embargo, su activación descontrolada puede generar más daño que el factor que lo desencadenó, ocasionando cicatrizaciones atróficas, inflamación crónica e incluso inflamación sistémica como las observadas en Lupus, artritis, enfermedad de Crohn o sepsis. Afortunadamente existen medios de control inflamatorio, entre los que se encuentran los mecanismos neuronales, que podrían ser parte de nuevas estrategias terapéuticas a estudiar para un mejor dominio de este tipo de patologías.

En la última década se ha descrito la vía colinérgica como parte de los mecanismos neuronales que pueden ser activados de manera exógena para el control no farmacológico de enfermedades inflamatorias. El propósito de esta revisión es exponer las evidencias en investigación básica sobre el tema y fomentar su estudio para la aplicación clínica.



Palabras clave:

Nervio vago, Neuroinmunología, inflamación.

Abstract - The innate immune system is the first line of defense involved in protecting against external pathogens and is crucial for survival. However, uncontrolled activation of the immune system can result in more damage than the factor that triggered them causing atrophic scarring, chronic inflammation and even Systemic inflammation events such as Lupus, arthritis, Crohn's disease or sepsis. Fortunately, there are neuronal mechanisms of inflammatory control which could be part of new therapeutic strategies to be studied for a better control of this type of pathologies.

In the last decade, the cholinergic pathway has been described as part of the neuronal mechanisms that can be exogenously activated for the non-pharmacological control of inflammatory diseases, the aim of this review is present the evidence in basic research and encourage the research in medical practice.



Keywords:

Vagus nerve, Neuroimmunology, inflammation.

¹ Laboratorio de inmunología, Unidad de Investigación en Neuroinmunología, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca.
² Laboratorio de inmunología, Unidad de Investigación en Neuroinmunología, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. Cuerpo académico: "Investigación en Salud" UABJO-CA-63. Correo electrónico: rator1981@gmail.com

Introducción

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa involucrada en proteger contra agentes patógenos externos y es esencial para la supervivencia de todas las especies. Las células de estirpe inmune, como las dendríticas, neutrófilos, monocitos y macrófagos residentes, han sido clasificadas como los elementos primarios implicados en la inflamación aguda. Estas células centinelas detectan patógenos y sus patrones moleculares asociados (PAMPs) mediante receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), que al unirse con su ligando encienden cascadas de señalización con la subsecuente activación celular y liberación de mediadores solubles. Por ejemplo, citocinas y quimiocinas que median el reclutamiento y movilización hacia los sitios de infección para restaurar la homeostasis mediante la eliminación del agente causal y la reparación tisular. Sin embargo, la activación descontrolada del sistema inmune puede generar más daño que el factor que lo desencadenó, por lo que existen mecanismos de control inflamatorio que mantienen la homeostasis.

Los mecanismos neuronales de control inmune constituyen sistemas eficientes, aparentemente seleccionados por la evolución para erradicar la inflamación (Steinman, 2004). A la fecha se han descrito diferentes vías, entre las que destacan la vía endócrina dependiente de cortisol; la vía adrenérgica dependiente de catecolaminas; la peptidérgica como la dependiente de neuropéptido Y (NPY), y la vía colinérgica antiinflamatoria que inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias mediante señales que dependen de la integridad del nervio vago (Borovikova, Ivanova, Nardi, Zhang, Yang, Ombrellino y Tracey, 2000; Wang, Yu, Ochani, Amella, Tanovic, Susarla, y Tracey, 2003). Dichos mecanismos podrían formar parte de nuevas estrategias terapéuticas de control inflamatorio en patologías sistémicas, para las que hasta ahora no se cuenta con tratamiento eficiente, como la artritis, fibromialgia, pancreatitis o el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).

Generalidades del sistema nervioso y sus neurotransmisores

El sistema nervioso es una red de tejidos cuya unidad básica son las neuronas. Su función primordial es captar y procesar de manera rápida y eficaz señales del medio, tanto interno como externo, ejerciendo control y coordinación sobre los demás sistemas para lograr una adecuada interacción con el medio ambiente cambiante y conservar la homeostasis. Se le puede clasificar, desde el punto de vista funcional, en vías neurales del sistema nervioso somático (el cual coordina las funciones voluntarias) y vías neuronales del sistema nervioso autónomo (que regula las involuntarias). A su vez, el sistema nervioso autónomo se divide en sistema nervioso simpático (SNS) y sistema nervioso parasimpático (SNPS), los cuales tienen encomiendas mayormente antagónicas entre ellos (Buijs, 2013); no obstante, en términos de control neuroinmune pueden converger (Ulloa, Quiroz-Gonzalez y Torres-Rosas, 2017).

El neurotransmisor principal del SNPS es la acetilcolina, la cual se sintetiza en la terminal del axón y se deposita en vesículas sinápticas (Burnstock, 2013). Esta síntesis sucede por unión del grupo acetilo de la acetilcoenzima A con la colina, neurotransmisor que activa dos principales tipos de receptores: muscarínicos (mAChRs) y nicotínicos (nAChRs), denominados así por los efectos de la muscarina, la cual acciona sólo a los receptores muscarínicos, pero no a los nicotínicos, en tanto que la nicotina únicamente activa a estos últimos (Shimohama, Taniguchi, Fujiwara y Kameyama, 1985).

Los mAChRs se dividen en cinco subtipos (M_1 - M_5) y se encuentran en células efectoras que pueden ser estimuladas por las neuronas posganglionares del sistema nervioso parasimpático, ejemplo de ellos son los mAChRs M_2 en cardiomiocitos (Yang, Chen, Sung, Hsu y Wu, 1993), así también en las estimuladas por las neuronas colinérgicas posganglionares del sistema nervioso simpático, ejemplo de lo anterior es el nervio esplénico (Rosas-Ballina, Ochani, Parrish, Ochani, Harris, Huston y Tracey, 2008). Los

nAChRs se encuentran distribuidos en las sinapsis entre las neuronas pre y posganglionares de los sistemas simpático y parasimpático, así como en las membranas de fibras musculares esqueléticas en la unión neuromuscular y en células efectoras, como las beta del páncreas (Delbro, 2012).

Los neurotransmisores del SNS son la dopamina (DA), adrenalina (A) y noradrenalina (NA), dichas catecolaminas se sintetizan a partir de la tirosina, este aminoácido es captado de la circulación por un proceso de transporte activo hacia el interior axonal, posteriormente se hidroxila para formar dopa, luego se descarboxila para generar dopamina y finalmente se hidroxila en la posición beta de la cadena lateral para formar noradrenalina, la cual se metila por acción de la N-metil-transferasa, formando adrenalina (Eisenhofer, Kopin y Goldstein, 2004). Existen receptores específicos para cada catecolamina endógena o su análogo sintético, empero, pueden activar la mayoría de la gama de receptores, dependiendo el tiempo y la concentración de las mismas.

Regulación adrenérgica del sistema inmune

Como se mencionó previamente, los sistemas nerviosos parasimpático y simpático mantienen la homeostasis al regular la actividad de aquellos órganos que no están controlados por el sistema nervioso voluntario consciente. Ejemplo de ello son las respuestas rápidas del sistema cardiovascular asociadas a cambios en el volumen sanguíneo. Por otra parte, hay evidencias de que el sistema inmune también es regulado por el SNS; así, la primera relación entre ambos sistemas es anatómica, ya que se ha reportado que tanto órganos linfoides primarios como secundarios reciben fibras nerviosas simpáticas (Felten, Felten, Bellinger, Carlson, Ackerman, Madden y Livnat, 1987). A nivel del bazo, timo y nódulos linfáticos, hay un gran número de terminales nerviosas en el parénquima de la pulpa blanca del bazo, así como en la zona periarteriolar

adyacentes a linfocitos CD4 y CD8, próximos a macrófagos y linfocitos B de ganglios linfáticos (Felten, Madden, Bellinger, Kruszewska, Moynihan y Felten, 1998). El nivel de noradrenalina liberado en las terminales nerviosas en las proximidades de estas células es de aproximadamente 1×10^{-5} M (Shimizu, Hori y Nakane, 1994), mientras que la cantidad de adrenalina liberada a la circulación durante periodos de estrés puede alcanzar concentraciones de 1×10^{-7} M en plasma. Así, las células en estos dos compartimentos pueden estar expuestas a diferentes concentraciones de catecolaminas, dependiendo de si es comunicación parácrina o endócrina. También se ha reportado que existen terminales nerviosas dopaminérgicas en tejidos linfoides (Bencsics, Sershen, Baranyi, Hashim, Lajtha y Vizi, 1997), razón por la que es posible sugerir que las células de estirpe inmune pueden estar en contacto con dopamina a nivel de bazo, médula ósea y el sistema circulatorio (Basu, Dasgupta, Lahiri y Chowdhury, 1993).

Se cuenta con evidencias de que el organismo, al encontrarse con un antígeno, induce activación del SNS y la consecuente liberación de noradrenalina en el tejido linfoide, independientemente de la respuesta al estrés que incluye la producción y liberación de noradrenalina y adrenalina. Infecciones sistémicas (Avila, Ulloa, Gonzalez, Moreno y Diaz-Nido, 1994) o inoculación de LPS aumentan los niveles de NA liberada en el bazo durante las primeras horas de exposición (Kohm y Sanders, 2001). En el mismo sentido, antígenos proteicos solubles aumentan los niveles de NE en bazo y médula entre las 9 y 10 h posteriores a la inoculación (Kohm, Tang, Sanders y Jones, 2000), sugiriendo que la distribución, el procesamiento y la presentación del antígeno, así como la producción de citocinas concomitantes, ocurren antes de que el sistema nervioso simpático sea activado. Luego entonces, la activación del SNS sería uno de los mecanismos por los cuales el cerebro puede comunicarse con células del sistema inmunológico y regular la magnitud de la respuesta inmune que

resulta de la presencia de antígenos, PAMPS o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Dado que las terminales nerviosas periféricas aferentes poseen receptores a citocinas y otros mediadores de la inflamación, la activación del sistema nervioso puede ser iniciada, inclusive potenciada, en estas terminales nerviosas o a nivel postganglionar y luego viajar hacia el sistema nervioso central (Straub, 2004).

Receptores adrenérgicos en células del sistema inmune

Los receptores adrenérgicos (AR) se agrupan en dos familias α y β . La familia α AR incluye los subtipos $\alpha 1$ ($\alpha 1$ AR) y $\alpha 2$ ($\alpha 2$ AR), mientras que la familia de β AR comprende a los subtipos $\beta 1$ ($\beta 1$ AR) al $\beta 3$ ($\beta 3$ AR). Estos receptores pueden ser activados mediante la unión de catecolaminas como DA, NA y A. Tal unión se identificó en células de tipo inmune y son saturables, reversibles y con alta afinidad (Ramer-Quinn, Baker y Sanders, 1997). En células del sistema inmune innato, como polimorfonucleares (PMN), mastocitos, monocitos/macrófagos o *Natural Killers* (NK), se expresan varios subtipos de receptores adrenérgicos, siendo el más frecuente el $\beta 2$ AR (Elenkov, Wilder, Chrousos y Vizi, 2000), aunque en monocitos de sangre periférica y macrófagos residentes de tejidos humanos se ha reportado la presencia del subtipo $\beta 1$ AR (Speidl, Toller, Kaun, Weiss, Pfaffenberger, Kastl y Wojta, 2004). Por otra parte, las células dendríticas expresan el $\alpha 1$ AR (Maestroni, 2000), $\alpha 2$ AR, $\beta 1$ AR y $\beta 2$ AR (Maestroni y Mazzola, 2003) en contraste con las células NK, que sólo expresan el subtipo $\beta 2$ AR (Jetschmann, Benschop, Jacobs, Kemper, Oberbeck, Schmidt y Schedlowski, 1997).

La expresión de los subtipos de AR en células del sistema inmune innato no es estática, se encuentra regulada por la activación celular y la acción de varias hormonas que modifican los niveles de receptores en estados como el séptico, donde los $\beta 2$ AR están aumentados en células de Kupffer (Hahn, Yoo, Ba, Chaudry y Wang, 1998). En el mismo sentido, este receptor en células polimorfo-nucleares (PMN) de

humano se expresa más en las obtenidas de muestras de mujeres, en comparación con las de los hombres, sugiriendo que podría existir una relación entre hormonas sexuales y la regulación en la expresión de $\beta 2$ AR en estas células (De Coupade, Gear, Dazin, Sroussi, Green y Levine, 2004). Se cuenta con pocos datos sobre la presencia de α AR en células del sistema inmune innato. Líneas celulares derivadas de monocitos expresan niveles detectables de mRNA para $\alpha 1$ AR; sin embargo, es indetectable en monocitos de individuos sanos (Heijnen, Rouppe, Van de Pol y Kavelaars, 2002; Heijnen, Rouppe van der Voort, Wulffraat, Van der Net, Kuis y Kavelaars, 1996). Por otra parte, tras la activación con fitohemaglutinina o en presencia de glucocorticoides, como la dexametasona, la cantidad de $\alpha 1$ AR en líneas monocíticas cambia (Rouppe, Kavelaars, Van de Pol y Heijnen, 2000), así como en monocitos de sangre periférica (Kavelaars, 2002). Otros estudios reportan que macrófagos peritoneales múridos expresan $\alpha 2$ AR funcionales que al unirse con su ligando inducen la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1) (Miles, Lafuse, & Zwillig, 1996).

Existen cinco subtipos de receptores dopaminérgicos divididos en dos familias: receptores tipo D1 y D2. Los receptores de clase D1 incluye los subtipos D1 y D5, los cuales inducen un aumento del cAMP intracelular. En contraste, los receptores tipo D2 abarcan los subtipos D2, D3 y D4, que disminuyen el cAMP intracelular tras la activación con su ligando (Missale, Nash, Robinson, Jaber y Caron, 1998). Hay evidencia de que en linfocitos de ratón se expresan receptores de estas dos familias y que en estos organismos los receptores tipo 2 están involucrados en la supresión de respuestas de inmunidad celular dependientes de $IFN\gamma$ e IL-2 y en el aumento de polarización a inmunidad humoral dependiente de IL-4 e IL-13, mediante inhibición de la vía de CAMP-CREB (Huang, Qiu, Peng, Liu, Huang y Qiu, 2010). La expresión de receptores subtipo D1 ha sido reportada en linfocitos donde pueden promover

la diferenciación a Th2 e inducir la degranulación en mastocitos (Mori, Kabashima, Fukamachi, Kuroda, Sakabe, Kobayashi y Tokura, 2013). Por otro lado, antagonistas de este receptor atenúan la respuesta Th17 a ovoalbúmina y la inflamación de vías aéreas inducida por neutrófilos (Nakagome, Imamura, Okada, Kawahata, Inoue, Hashimoto y Matsushita, 2011).

Los receptores D1, D2, D3, D4 y D5 se han identificado en linfocitos humanos, teniendo en ellos un efecto activador o inhibidor para los tipos D1 o D2, respectivamente (Amenta, Bronzetti, Felici, Ricci y Tayebati, 1999; Ostadali, Ahangari, Eslami, Razavi, Zarrindast, Ahmadkhaniha y Boulhari, 2004; Nagai, Ueno, Saeki, Soga y Yanagihara, 1993; Bondy, De Jonge, Pander, Primbs y Ackenheil, 1996; Takahashi, Nagai, Ueno, Saeki y Yanagihara, 1992). Se ha reportado que tanto linfocitos como monocitos expresan baja cantidad de estos receptores dopaminérgicos, en contraste con neutrófilos y eosinófilos, que los expresan de manera moderada y tanto linfocitos B como células NK tienen una expresión alta y consistente de receptores para DA (McKenna, McLaughlin, Lewis, Sibbring, Cummerson, Bowen-Jones y Moots, 2002). Asimismo, los receptores D1 están presentes en células dendríticas (Nakano, Higashi, Takagi, Hashimoto, Tanaka y Matsushita, 2009) y algunos estudios sugieren la capacidad de linfocitos humanos para producir DA (Amenta, Bronzetti, Cantalamessa, El-Assouad, Felici, Ricci y Tayebati, 2001; Mill, Asherson, Browes, D'Souza y Craig, 2002). El contacto de estas células con la catecolamina puede ser muy estrecho (Basu *et al.*, 1993), ya que es posible sintetizar y liberar la dopamina por linfocitos T y células dendríticas, y puede actuar tanto de manera autócrina como parácrina (Bergquist, Tarkowski, Ekman y Ewing, 1994; Cosentino, Fietta, Ferrari, Rasini, Bombelli, Carcano y Lecchini, 2007; Nakano *et al.*, 2009). Debido a su localización, las células de estirpe inmune pueden estar en contacto con dopamina

a nivel de bazo, medula ósea y en la circulación (Basu *et al.*, 1993).

Regulación colinérgica del sistema inmune

Del sistema nervioso central emergen los nervios del SNPS, que incluyen algunos espinales en el sacro denominados espláncnicos pélvicos, varios nervios craneales como el facial, el oculomotor, el glossofaríngeo y el nervio vago, considerado como el efector neural predominante de dicho sistema. El vago se encuentra privilegiadamente posicionado en la interface entre el sistema inmune y el sistema nervioso, innervando los órganos y vías de entrada para patógenos y sus productos, como lo puede ser el aparato respiratorio, el digestivo y el urinario (Pereira y Leite, 2016); es un nervio tanto sensitivo como motor, tiene comunicación con órganos y vísceras de los diferentes aparatos y sistemas de la economía, lo que permite una regulación bidireccional de inflamación y defensa contra bacterias del huésped (Lai, Mills y Chiu, 2017; Willemze, Luyer, Buurman y De Jonge, 2015). La activación del sistema inmune en tejidos periféricos puede inducir señales aferentes en el nervio vago dependientes de IL-1 o de endotoxina, propiciando fiebre por la relación anatómica vagal-hipotámica (Dantzer, 2001; Gaige, Abou, Abysique y Bouvier, 2004), aunque dichos focos inflamatorios también pueden accionar al vago mediante mecanorreceptores, termorreceptores y sensores de osmolaridad (Adachi, 1984). Este nervio cuenta con distintos tipos de fibras: las eferentes viscerales generales, las aferentes somáticas generales y especiales, así como las aferentes viscerales generales. La mayor parte de ellas tienen su origen en el ganglio nodoso y están compuestas por fibras aferentes viscerales generales, que hacen sinapsis con el núcleo del tracto solitario (NTS), la formación reticular media, el núcleo motor dorsal del vago, el área postrema y el núcleo cuneatus (Rutecki, 1990). 95% de las fibras del vago aferente tienen proyecciones al núcleo del tracto solitario, el

cual a su vez se conecta con el núcleo paratrigeminal, la formación reticular media, el hipotálamo y el tálamo vía el núcleo parabranchial, amígdala hipocampo y el rafe dorsal (Beckstead, Morse y Norgren, 1980; Magdaleno-Madrigal, Martínez-Vargas, Valdés-Cruz, Almazán-Alvarado y Fernández-Mas, 2010), lo que sugiere que uno de los mecanismos aferentes del vago es dependiente de la activación del NTS y el tálamo.

Diferentes grupos de investigación han reportado que la estimulación eferente y directa del nervio vago puede modular la inflamación sistémica en modelos animales de isquemia (Bernik, Friedman, Ochani, DiRaimo, Susarla, Czura y Tracey, 2002), hemorragia y resucitación (Cai, Chenji, Kiss, De Jonge, Conejero-Goldberg y Ulloa, 2009), pancreatitis (Van Westerloo, Giebelen, Florquin, Bruno, Larosa, Ulloa y Van der Poll, 2006), colitis (Pullan, Rhodes, Ganesh, Mani, Morris, Williams, Newcombe, Russell, Feyerabend, Thomas y Sawe, 1994), endotoxemia (Rosas-Ballina *et al.*, 2008), choque séptico y sepsis severa (Van Westerloo, Giebelen, Florquin, Daalhuisen, Bruno, De Vos y Van der Poll, 2005). Estas observaciones hicieron emerger la propuesta de analizar agonistas colinérgicos como mediadores antiinflamatorios; sin embargo, estudios posteriores mostraron que la vía colinérgica antiinflamatoria no pertenecía a una vía meramente parasimpática, ya que se requería de la integridad de fibras nerviosas simpáticas (Rosas-Ballina *et al.*, 2008), así como de la liberación de catecolaminas del tipo de la noradrenalina (Vida, Pena, Deitch y Ulloa, 2011). En términos de inmunología, la separación de los sistemas simpático y parasimpático no es correcta, ya que ambos pueden ejercer un efecto antiinflamatorio, lo que sugiere un efecto convergente. La activación exógena puede realizarse mediante la estimulación eléctrica del nervio vago a nivel cervical en sus fibras aferentes o eferentes, o por estímulos similares a nivel del nervio ciático; el primero ejerce un efecto antiinflamatorio dependiente de la liberación de noradrenalina, que al unirse al receptor α_2 adrenérgico en linfocitos T induce la producción de acetilcolina

con capacidad antiinflamatoria; el segundo puede desencadenar una respuesta antiinflamatoria vagal, dependiente de liberación de dopamina y de expresión de receptores D1 en macrófagos (figura 1) (Huston, Gallowitsch-Puerta, Ochani, Ochani, Yuan, Rosas-Ballina y Tracey, 2007; Torres-Rosas, Yehia, Pena, Mishra, Thompson-Bonilla, Moreno-Eutimio y Ulloa, 2014).

Receptores colinérgicos en células del sistema inmune

El sistema de control neuroinmune, dependiente del nervio vago, ha sido denominado "vía colinérgica antiinflamatoria" e inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias mediante señales que dependen de la integridad del nervio vago eferente (Borovikova, *et al.*, 2000; Czura, Friedman y Tracey, 2003; H. Wang *et al.*, 2003). La sinapsis entre los nervios colinérgicos y el sistema inmune innato requiere de la expresión de receptores para neurotransmisores expresado en macrófagos y linfocitos que participan en la respuesta inflamatoria (Vida, Pena, Kanashiro, *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2003). Tan es así, que agonistas colinérgicos, incluyendo la nicotina, la acetilcolina y algunos fármacos experimentales como el CNI-1493, inhiben la liberación de TNF y otras citocinas sin modificar la producción de citocinas antiinflamatorias como el IL-10 (Borovikova *et al.*, 2000; Wang, Liao, Ochani, Justiniani, Lin, Yang y Ulloa, 2004).

El receptor más estudiado ha sido el α_7 nAChR en macrófagos, el cual puede inducir una respuesta antiinflamatoria independiente de las activadas por receptores muscarínicos, mismas que se han reportado para linfocitos y monocitos (Kawashima y Fujii, 2003 y 2003a). La unión de este receptor con su ligando inhibe la activación por endotoxina de NF-kB (Wang *et al.*, 2004) e induce la transcripción de STAT3 a través de un mecanismo dependiente de JAK2 (De Jonge, Van der Zanden, The, Bijlsma, Van Westerloo, Bennink y Boeckxstaens, 2005).

Existen varios subtipos receptores colinérgicos en otras células inmunocompetentes, como linfocitos

B y T, células dendríticas, endoteliales y epiteliales en intestino y pulmón (Zia, Ndoye, Nguyen y Grando, 1997). Se sabe que los monocitos polimorfonucleares, neutrófilos, eosinófilos y los basófilos manifiestan múltiples subtipos de receptores nicotínicos, incluyendo $\alpha 4 \beta 2$ y $\alpha 3 \beta 4$ (Benhammou, Lee, Strook, Sullivan, Logel, Raschen y Leonard, 2000). Además, linfocitos humanos expresan receptores nicotínicos funcionales que modulan la activación linfocitaria y de macrófagos (De Rosa, Dionisio, Agriello, Bouzat y Esandi Mdel, 2009). En este sentido, se ha reportado que hay sistemas de control de producción de citocinas que funcionan con la acetilcolina producida de manera autócrina y se ha reportado, en líneas celulares, que la aplicación de LPS induce la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\alpha 10$ (Chernyavsky, Arredondo, Skok y Grando, 2010), las cuales al ser activadas por acetilcolina tienen un efecto antiinflamatorio, inhibiendo la vía de JAK2; en el mismo sentido mAChR M_1 - M_5 se expresan en mononucleares de sangre periférica, células dendríticas y macrófagos. La activación de M_1 , M_3 y M_5 generan formación de inositol 1,3,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol, que actúan como segundos mensajeros, movilizando calcio intracelular y activando proteína quinasa C (PKC), los M_2 y M_4 inhiben la adenilciclase y disminuyen la formación del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Fujii, Mashimo, Moriwaki, Misawa, Ono, Horiguchi, y Kawashima, 2017).

Medicina traslacional complementaria y neuroinmunología

Algunas disciplinas médicas complementarias controlan el dolor e inflamación mediante estimulación con técnicas no invasivas de fibras nerviosas periféricas, ejemplo de ellas son la fisioterapia, masoterapia, tuina y la acupuntura, esta última es una rama de la medicina tradicional china en la que por medio de puntos (acupuntos) específicos altamente inervados se modifican variables biológicas con efectos terapéuticos (Quiroz-González, Torres-

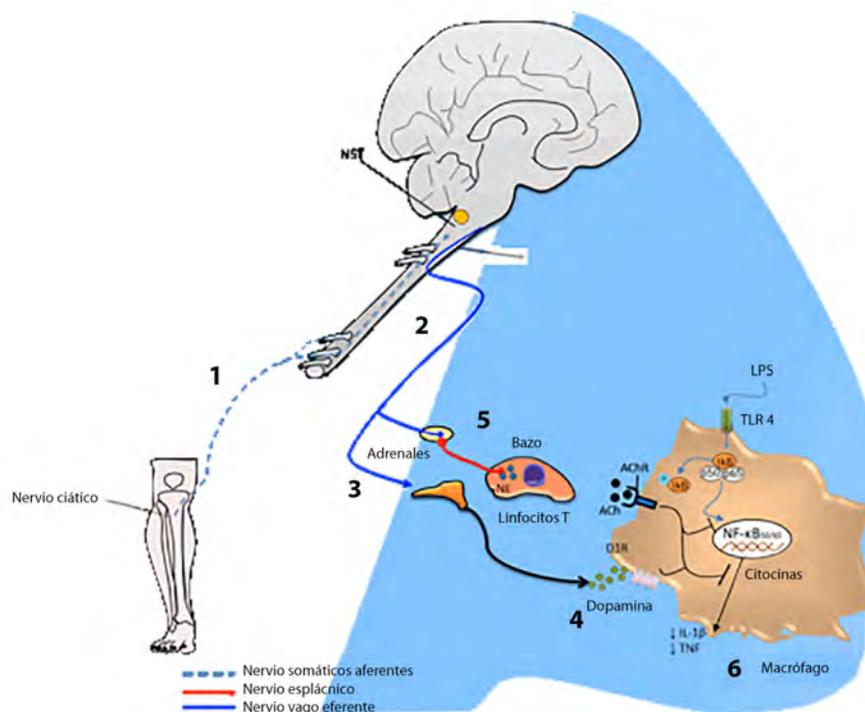
Castillo, López-Gómez y Jiménez Estrada, 2017; Ueda, Hayashi y Kuriowa, 2005). Existen 365 acupuntos, algunos de ellos con efectos antiinflamatorios como el PC6, el ST36, LI4 y el BL60, los cuales disminuyen la producción de mediadores inflamatorios solubles y el daño en intestino, riñón, hígado y miocardio en diferentes modelos de isquemia/reperfusión e inflamación sistémica por mecanismos dependientes de integridad del nervio vago o receptores para neurotransmisores (Baek, Choi, Yang y Park, 2005; Du, Luo, Hu, Lv, Lin y Ma, 2013; Li, Shi, Tang, Zhang y Hu, 2016; Wang, Wang, Shi, Qi, Hu, Tong y Litscher, 2015; Wang, Chen, Gao, Luo Liu, 2008; Zhu, Xing, Lei, Wu, Wang, Huang y Jiang, 2015). El mecanismo de acción eferente de la acupuntura depende no solamente del punto, sino también del tipo de estimulación; la más estudiada por su fácil estandarización es la eléctrica; por ejemplo, al punto ST36 con uso en clínica ante problemas dolorosos e inflamatorios como artritis, colitis, asma y conocido efecto modulador de la cinética del movimiento gástrico, se le ha demostrado en modelos animales que la estimulación constante con 10 Hz a 3 mA induce la activación de neuronas productoras de CRH (hormona liberadora de corticotropina) en el núcleo paraventricular y producción de ACTH (hormona adrenocorticotrópica) (Li, Lao, Wang, Xin, Ren, Berman y Zhang, 2008) y la producción de cortisol (vía HPA). En el mismo sentido, la estimulación constante a frecuencias bajas de 2Hz induce la activación de neuronas en el núcleo del tracto solitario (NTS), mientras que frecuencias altas de 100 Hz no lo activan (Fang, Du, Shao, Fang y Liu, 2017), lo que se refleja en efectos antiinflamatorios en modelos de artritis, donde el resultado terapéutico dependiente de receptores colinérgicos se observa con estimulación a 2Hz y no a 100Hz (vía parasimpática) (Seo, Sung, Park y Baek, 2016); muy altas frecuencias de 120 Hz estimulan la vía simpática adrenal con efectos antiinflamatorios (Kim, Uh, Yoon, Roh, Kwon, Han y Lee, 2008) y muy bajas frecuencias (1Hz) tienen un impacto antiinflamatorio dependiente de activación

postganglionar de nervios simpáticos (Kim, Kang, Yoon, Roh, Kwon, Han y Lee, 2007); en el manejo del dolor también existen efectos divergentes, dependiendo el tipo de estimulación del punto ST-36. Bajas frecuencias (10 Hz) lo inhiben por un mecanismo dependiente del sistema serotoninérgico, mientras que frecuencias altas (100 Hz) hacen lo mismo por un mecanismo dependiente de receptores opiáceos (Kuo, Tsai, Lin, Su y Chen, 2013). Por otro lado, frecuencias bajas aplicadas a ST36 tienen efectos hipoglucémicos, no así las altas (Figueiredo, Silva, Prado, Hissa, Vasconcelos y Guimaraes, 2011); lo anterior parece ser mediado por un mecanismo dependiente del parasimpático (Lee,

Li, Tzeng, Chen, Ho, Lin y Chang, 2011; Lin, Chen, Tzeng, Lee, Cheng, Chen y Chang, 2011). Frecuencias medias (25 Hz 6mA) en ST36 inducen movimientos peristálticos por activación vagal eferente y frecuencias altas inhiben dichos movimientos por activación del simpático (Song, Yin y Chen, 2015). Estos estudios son importantes en el diseño de dispositivos no invasivos para estimulación y activación específica de vías neuronales con capacidad terapéutica, así como para la apertura a la investigación de nuevos fármacos de opción al tratamiento de patologías inflamatorias que en este momento no cuentan con una terapéutica eficaz y eficiente.

Figura 1.

Activación exógena de la vía colinérgica y respuesta inflamatoria. Al ser estimulado el nervio ciático aferente (1), activa una respuesta dependiente del nervio vago eferente (2) que induce la liberación de dopamina por parte de las glándulas adrenales (3); esta catecolamina, al unirse al receptor adrenérgico D1, inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias (4). Al ser estimulado, el nervio vago eferente induce la liberación de noradrenalina por el nervio esplénico, que al unirse a su receptor, impulsa la producción de acetilcolina en linfocitos T (5), la cual inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias (6).



NTS: núcleo de tracto solitario; NE: noradrenalina; Ach: acetilcolina; AChR: receptor para acetilcolina; D1R: receptor dopaminérgico tipo 1.

Bibliografía

- Adachi, A. (1984). Thermosensitive and osmoreceptive afferent fibers in the hepatic branch of the vagus nerve. *J Auton Nerv Syst*, 10(3-4), 269-273.
- Amenta, F., Bronzetti, E., Felici, L., Ricci, A. y Tayebati, S. K. (1999). Dopamine D2-like receptors on human peripheral blood lymphocytes: a radioligand binding assay and immunocytochemical study. *J Auton Pharmacol*, 19(3), 151-159.
- Amenta, F., Bronzetti, E., Cantalamessa, F., El-Assouad, D., Felici, L., Ricci, A. y Tayebati, S. K. (2001). Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol*, 117(1-2), 133-142.
- Avila, J., Ulloa, L., Gonzalez, J., Moreno, F. y Diaz-Nido, J. (1994). Phosphorylation of microtubule-associated proteins by protein kinase CK2 in neuritogenesis. *Cell Mol Biol Res*, 40(5-6), 573-579.
- Baek, Y. H., Choi, D. Y., Yang, H. I. y Park, D. S. (2005). Analgesic effect of electroacupuncture on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: mediation by cholinergic and serotonergic receptors. *Brain Res*, 1057(1-2), 181-185. doi: 10.1016/j.brainres.2005.07.014
- Basu, S., Dasgupta, P. S., Lahiri, T. y Chowdhury, J. R. (1993). Uptake and biodistribution of dopamine in bone marrow, spleen and lymph nodes of normal and tumor bearing mice. *Life Sci*, 53(5), 415-424.
- Beckstead, R. M., Morse, J. R. y Norgren, R. (1980). The nucleus of the solitary tract in the monkey: projections to the thalamus and brain stem nuclei. *J Comp Neurol*, 190(2), 259-282. doi: 10.1002/cne.901900205
- Bencsics, A., Sershen, H., Baranyi, M., Hashim, A., Lajtha, A. y Vizi, E. S. (1997). Dopamine, as well as norepinephrine, is a link between noradrenergic nerve terminals and splenocytes. *Brain Res*, 761(2), 236-243.
- Benhammou, K., Lee, M., Strook, M., Sullivan, B., Logel, J., Raschen, K. y Leonard, S. (2000). [(3)H] Nicotine binding in peripheral blood cells of smokers is correlated with the number of cigarettes smoked per day. *Neuropharmacology*, 39(13), 2818-2829.
- Bergquist, J., Tarkowski, A., Ekman, R. y Ewing, A. (1994). Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(26), 12912-12916.
- Bernik, T. R., Friedman, S. G., Ochani, M., DiRaimo, R., Susarla, S., Czura, C. J. y Tracey, K. J. (2002). Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg*, 36(6), 1231-1236. doi: 10.1067/mva.2002.129643
- Bondy, B., De Jonge, S., Pander, S., Primbs, J. y Ackenheil, M. (1996). Identification of dopamine D4 receptor mRNA in circulating human lymphocytes using nested polymerase chain reaction. *J Neuroimmunol*, 71(1-2), 139-144.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Nardi, D., Zhang, M., Yang, H., Ombrellino, M. y Tracey, K. J. (2000). Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci*, 85(1-3), 141-147. doi: 10.1016/S1566-0702(00)00233-2
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., y Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405(6785), 458-462. doi: 10.1038/35013070

- Buijs, R. M. (2013). The autonomic nervous system: a balancing act. *Handb Clin Neurol*, 117, 1-11. doi: 10.1016/B978-0-444-53491-0.00001-8
- Burnstock, G. (2013). Cotransmission in the autonomic nervous system. *Handb Clin Neurol*, 117, 23-35. doi: 10.1016/B978-0-444-53491-0.00003-1
- Cai, B., Chen, F., Ji, Y., Kiss, L., De Jonge, W. J., Conejero-Goldberg, C., y Ulloa, L. (2009). Alpha7 cholinergic-agonist prevents systemic inflammation and improves survival during resuscitation. *J Cell Mol Med*, 13(9B), 3774-3785. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00550.x
- Cosentino, M., Fietta, A. M., Ferrari, M., Rasini, E., Bombelli, R., Carcano, E. y Lecchini, S. (2007). Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood*, 109(2), 632-642. doi: 10.1182/blood-2006-01-028423
- Czura, C. J., Friedman, S. G. y Tracey, K. J. (2003). Neural inhibition of inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Endotoxin Res*, 9(6), 409-413. doi: 10.1179/096805103225002755
- Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Skok, M. y Grando, S. A. (2010). Auto/paracrine control of inflammatory cytokines by acetylcholine in macrophage-like U937 cells through nicotinic receptors. *Int Immunopharmacol*, 10(3), 308-315. doi: 10.1016/j.intimp.2009.12.001
- Dantzer, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci*, 933, 222-234.
- De Coupade, C., Gear, R. W., Dazin, P. F., Sroussi, H. Y., Green, P. G. y Levine, J. D. (2004). Beta 2-adrenergic receptor regulation of human neutrophil function is sexually dimorphic. *Br J Pharmacol*, 143(8), 1033-1041. doi: 10.1038/sj.bjp.0705972
- De Jonge, W. J., Van der Zanden, E. P., The, F. O., Bijlsma, M. F., Van Westerloo, D. J., Bennink, R. J. y Boeckxstaens, G. E. (2005). Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol*, 6(8), 844-851. doi: 10.1038/ni1229
- De Rosa, M. J., Dionisio, L., Agriello, E., Bouzat, C. y Esandi Mdel, C. (2009). Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor modulates lymphocyte activation. *Life Sci*, 85(11-12), 444-449. doi: 10.1016/j.lfs.2009.07.010
- Delbro, D. S. (2012). Expression of the non-neuronal cholinergic system in rat beta-cells. *Auton Neurosci*, 167(1-2), 75-77. doi: 10.1016/j.autneu.2011.11.006
- Du, M. H., Luo, H. M., Hu, S., Lv, Y., Lin, Z. L. y Ma, L. (2013). Electroacupuncture improves gut barrier dysfunction in prolonged hemorrhagic shock rats through vagus anti-inflammatory mechanism. *World J Gastroenterol*, 19(36), 5988-5999. doi: 10.3748/wjg.v19.i36.5988
- Eisenhofer, G., Kopin, I. J. y Goldstein, D. S. (2004). Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev*, 56(3), 331-349. doi: 10.1124/pr.56.3.1
- Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P. y Vizi, E. S. (2000). The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*, 52(4), 595-638.
- Fang, J. F., Du, J. Y., Shao, X. M., Fang, J. Q. y Liu, Z. (2017). Effect of Electroacupuncture on the NTS is modulated primarily by acupuncture point selection

- and stimulation frequency in normal rats. *BMC Complement Altern Med*, 17(1), 182. doi: 10.1186/s12906-017-1690-7
- Felten, D. L., Felten, S. Y., Bellinger, D. L., Carlson, S. L., Ackerman, K. D., Madden, K. S. y Livnat, S. (1987). Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev*, 100, 225-260.
- Felten, S. Y., Madden, K. S., Bellinger, D. L., Kruszewska, B., Moynihan, J. A. y Felten, D. L. (1998). The role of the sympathetic nervous system in the modulation of immune responses. *Adv Pharmacol*, 42, 583-587.
- Figueiredo, L. M., Silva, A. H., Prado Neto, A. X., Hissa, M. N., Vasconcelos, P. R. y Guimaraes, S. B. (2011). Electroacupuncture stimulation using different frequencies (10 and 100 Hz) changes the energy metabolism in induced hyperglycemic rats. *Acta Cir Bras*, 26 Suppl 1, 47-52.
- Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K. y Kawashima, K. (2017). Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front Immunol*, 8, 1085. doi: 10.3389/fimmu.2017.01085
- Gaige, S., Abou, E., Abysique, A. y Bouvier, M. (2004). Effects of interactions between interleukin-1 beta and leptin on cat intestinal vagal mechanoreceptors. *J Physiol*, 555(Pt 1), 297-310. doi: 10.1113/jphysiol.2003.054379
- Hahn, P. Y., Yoo, P., Ba, Z. F., Chaudry, I. H. y Wang, P. (1998). Upregulation of Kupffer cell beta-adrenoceptors and cAMP levels during the late stage of sepsis. *Biochim Biophys Acta*, 1404(3), 377-384.
- Heijnen, C. J., Rouppe van der Voort, C., Wulffraat, N., Van der Net, J., Kuis, W. y Kavelaars, A. (1996). Functional alpha 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Neuroimmunol*, 71(1-2), 223-226.
- Heijnen, C. J., Rouppe van der Voort, C., Van de Pol, M. y Kavelaars, A. (2002). Cytokines regulate alpha(1)-adrenergic receptor mRNA expression in human monocytic cells and endothelial cells. *J Neuroimmunol*, 125(1-2), 66-72.
- Huang, Y., Qiu, A. W., Peng, Y. P., Liu, Y., Huang, H. W. y Qiu, Y. H. (2010). Roles of dopamine receptor subtypes in mediating modulation of T lymphocyte function. *Neuro Endocrinol Lett*, 31(6), 782-791.
- Huston, J. M., Gallowitsch-Puerta, M., Ochani, M., Ochani, K., Yuan, R., Rosas-Ballina, M. y Tracey, K. J. (2007). Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis. *Crit Care Med*, 35(12), 2762-2768. doi: 10.1097/01.CCM.0000288102.15975.BA
- Jetschmann, J. U., Benschop, R. J., Jacobs, R., Kemper, A., Oberbeck, R., Schmidt, R. E. y Schedlowski, M. (1997). Expression and in-vivo modulation of alpha- and beta-adrenoceptors on human natural killer (CD16+) cells. *J Neuroimmunol*, 74(1-2), 159-164.
- Kavelaars, A. (2002). Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system. *Brain Behav Immun*, 16(6), 799-807.
- Kawashima, K. y Fujii, T. (2003). The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci*, 72(18-19), 2101-2109.
- Kawashima, K. y Fujii, T. (2003a). The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci*, 74(6), 675-696.
- Kim, H. W., Kang, S. Y., Yoon, S. Y., Roh, D. H., Kwon,

- Y. B., Han, H. J. y Lee, J. H. (2007). Low-frequency electroacupuncture suppresses zymosan-induced peripheral inflammation via activation of sympathetic post-ganglionic neurons. *Brain Res*, *1148*, 69-75. doi: 10.1016/j.brainres.2007.02.030
- Kim, H. W., Uh, D. K., Yoon, S. Y., Roh, D. H., Kwon, Y. B., Han, H. J. y Lee, J. H. (2008). Low-frequency electroacupuncture suppresses carrageenan-induced paw inflammation in mice via sympathetic post-ganglionic neurons, while high-frequency EA suppression is mediated by the sympathoadrenal medullary axis. *Brain Res Bull*, *75*(5), 698-705. doi: 10.1016/j.brainresbull.2007.11.015
- Kohm, A. P. y Sanders, V. M. (2001). Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol Rev*, *53*(4), 487-525.
- Kohm, A. P., Tang, Y., Sanders, V. M. y Jones, S. B. (2000). Activation of antigen-specific CD4+ Th2 cells and B cells in vivo increases norepinephrine release in the spleen and bone marrow. *J Immunol*, *165*(2), 725-733.
- Kuo, C. C., Tsai, H. Y., Lin, J. G., Su, H. L. y Chen, Y. F. (2013). Spinal Serotonergic and Opioid Receptors Are Involved in Electroacupuncture-Induced Antinociception at Different Frequencies on ZuSanLi (ST 36) Acupoint. *Evid Based Complement Alternat Med*, *2013*, 291972. doi: 10.1155/2013/291972
- Lai, N. Y., Mills, K. y Chiu, I. M. (2017). Sensory neuron regulation of gastrointestinal inflammation and bacterial host defence. *J Intern Med*, *282*(1), 5-23. doi: 10.1111/joim.12591
- Lee, Y. C., Li, T. M., Tzeng, C. Y., Chen, Y. I., Ho, W. J., Lin, J. G. y Chang, S. L. (2011). Electroacupuncture at the Zusanli (ST-36) Acupoint Induces a Hypoglycemic Effect by Stimulating the Cholinergic Nerve in a Rat Model of Streptozotocine-Induced Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Evid Based Complement Alternat Med*, *2011*, 650263. doi: 10.1093/ecam/neaq068
- Li, A., Lao, L., Wang, Y., Xin, J., Ren, K., Berman, B. M. y Zhang, R. (2008). Electroacupuncture activates corticotrophin-releasing hormone-containing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus to alleviate edema in a rat model of inflammation. *BMC Complement Altern Med*, *8*, 20. doi: 10.1186/1472-6882-8-20
- Li, Y. M., Shi, X., Tang, F. B., Zhang, W. H. y Hu, S. (2016). [Electroacupuncture at "Zusanli" (ST 36) Alleviates Myocardium Damage in Intestinal Ischemia-reperfusion Rats by Up-regulating Periphery Dopamine Level]. *Zhen Ci Yan Jiu*, *41*(3), 197-201.
- Lin, R. T., Chen, C. Y., Tzeng, C. Y., Lee, Y. C., Cheng, Y. W., Chen, Y. I. y Chang, S. L. (2011). Electroacupuncture improves glucose tolerance through cholinergic nerve and nitric oxide synthase effects in rats. *Neurosci Lett*, *494*(2), 114-118. doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.071
- Maestroni, G. J. (2000). Dendritic cell migration controlled by alpha 1b-adrenergic receptors. *J Immunol*, *165*(12), 6743-6747.
- Maestroni, G. J. y Mazzola, P. (2003). Langerhans cells beta 2-adrenoceptors: role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity. *J Neuroimmunol*, *144*(1-2), 91-99.
- Magdaleno-Madrigal, V. M., Martínez-Vargas, D., Valdés-Cruz, A., Almazán-Alvarado, S. y Fernández-Mas, R. (2010). Preemptive effect of nucleus of the solitary tract stimulation on amygdaloid kindling in freely moving cats. *Epilepsia*, *51*(3), 438-444. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02337.x

- McKenna, F., McLaughlin, P. J., Lewis, B. J., Sibbring, G. C., Cummerson, J. A., Bowen-Jones, D. y Moots, R. J. (2002). Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol*, 132(1-2), 34-40.
- Miles, B. A., Lafuse, W. P. y Zwillling, B. S. (1996). Binding of alpha-adrenergic receptors stimulates the anti-mycobacterial activity of murine peritoneal macrophages. *J Neuroimmunol*, 71(1-2), 19-24.
- Mill, J., Asherson, P., Browes, C., D'Souza, U. y Craig, I. (2002). Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet*, 114(8), 975-979. doi: 10.1002/ajmg.b.10948
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. y Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78(1), 189-225.
- Mori, T., Kabashima, K., Fukamachi, S., Kuroda, E., Sakabe, J. I., Kobayashi, M., y Tokura, Y. (2013). D1-like dopamine receptors antagonist inhibits cutaneous immune reactions mediated by Th2 and mast cells. *J Dermatol Sci*. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.03.008
- Nagai, Y., Ueno, S., Saeki, Y., Soga, F. y Yanagihara, T. (1993). Expression of the D3 dopamine receptor gene and a novel variant transcript generated by alternative splicing in human peripheral blood lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 194(1), 368-374. doi: 10.1006/bbrc.1993.1829
- Nakagome, K., Imamura, M., Okada, H., Kawahata, K., Inoue, T., Hashimoto, K. y Matsushita, S. (2011). Dopamine D1-like receptor antagonist attenuates Th17-mediated immune response and ovalbumin antigen-induced neutrophilic airway inflammation. *J Immunol*, 186(10), 5975-5982. doi: 10.4049/jimmunol.1001274
- Nakano, K., Higashi, T., Takagi, R., Hashimoto, K., Tanaka, Y. y Matsushita, S. (2009). Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol*, 21(6), 645-654. doi: 10.1093/intimm/dxp033
- Ostadali, M. R., Ahangari, G., Eslami, M. B., Razavi, A., Zarrindast, M. R., Ahmadkhaniha, H. R. y Boulhari, J. (2004). The Detection of Dopamine Gene Receptors (DRD1-DRD5) Expression on Human Peripheral Blood Lymphocytes by Real Time PCR. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 3(4), 169-174. doi: 03.04/ijaa.169174
- Pereira, M. R. y Leite, P. E. (2016). The Involvement of Parasympathetic and Sympathetic Nerve in the Inflammatory Reflex. *J Cell Physiol*, 231(9), 1862-1869. doi: 10.1002/jcp.25307
- Pullan, R. D., Rhodes, J., Ganesh, S., Mani, V., Morris, J. S., Williams, G. T., Newcombe, R., Russell, M., Feyerabend, C., Thomas, G. y Sawe, U. (1994). Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 330(12), 811-815. doi: 10.1056/NEJM199403243301202
- Quiroz-Gonzalez, S., Torres-Castillo, S., López-Gómez, R. E. y Jiménez Estrada, I. (2017). Acupuncture Points and Their Relationship with Multireceptive Fields of Neurons. *J Acupunct Meridian Stud*, 10(2), 81-89. doi: 10.1016/j.jams.2017.01.006
- Ramer-Quinn, D. S., Baker, R. A. y Sanders, V. M. (1997). Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. *J Immunol*, 159(10), 4857-4867.
- Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Parrish, W. R., Ochani, K., Harris, Y. T., Huston, J. M. y Tracey, K. J. (2008). Splenic

nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(31), 11008-11013. doi: 10.1073/pnas.0803237105

Roupe van der Voort, C., Kavelaars, A., Van de Pol, M. y Heijnen, C. J. (2000). Noradrenaline induces phosphorylation of ERK-2 in human peripheral blood mononuclear cells after induction of alpha(1)-adrenergic receptors. *J Neuroimmunol*, 108(1-2), 82-91.

Rutecki, P. (1990). Anatomical, physiological, and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation. *Epilepsia*, 31 Suppl 2, S1-6.

Seo, B. K., Sung, W. S., Park, Y. C. y Baek, Y. H. (2016). The electroacupuncture-induced analgesic effect mediated by 5-HT₁, 5-HT₃ receptor and muscarinic cholinergic receptors in rat model of collagenase-induced osteoarthritis. *BMC Complement Altern Med*, 16, 212. doi: 10.1186/s12906-016-1204-z

Shimizu, N., Hori, T. y Nakane, H. (1994). An interleukin-1 beta-induced noradrenaline release in the spleen is mediated by brain corticotropin-releasing factor: an in vivo microdialysis study in conscious rats. *Brain Behav Immun*, 8(1), 14-23. doi: 10.1006/brbi.1994.1002

Shimohama, S., Taniguchi, T., Fujiwara, M. y Kameyama, M. (1985). Biochemical characterization of the nicotinic cholinergic receptors in human brain: binding of (-)-[³H]nicotine. *J Neurochem*, 45(2), 604-610.

Song, J., Yin, J. y Chen, J. (2015). Needleless transcutaneous electroacupuncture improves rectal distension-induced impairment in intestinal motility and slow waves via vagal mechanisms in dogs. *Int J Clin Exp Med*, 8(3), 4635-4646.

Speidl, W. S., Toller, W. G., Kaun, C., Weiss, T. W., Pfaffenberger, S., Kastl, S. P. y Wojta, J. (2004). Catecholamines potentiate LPS-induced expression of MMP-1 and MMP-9 in human monocytes and in the human monocytic cell line U937: possible implications for peri-operative plaque instability. *FASEB J*, 18(3), 603-605. doi: 10.1096/fj.03-0454fje

Steinman, L. (2004). Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol*, 5(6), 575-581. doi: 10.1038/ni1078

Straub, R. H. (2004). Complexity of the bi-directional neuroimmune junction in the spleen. *Trends Pharmacol Sci*, 25(12), 640-646. doi: 10.1016/j.tips.2004.10.007

Takahashi, N., Nagai, Y., Ueno, S., Saeki, Y. y Yanagihara, T. (1992). Human peripheral blood lymphocytes express D5 dopamine receptor gene and transcribe the two pseudogenes. *FEBS Lett*, 314(1), 23-25.

Torres-Rosas, R., Yehia, G., Pena, G., Mishra, P., Thompson-Bonilla, M., Moreno-Eutimio, M. A. y Ulloa, L. (2014). Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nat Med*, 20(3), 291-295. doi: 10.1038/nm.3479

Ueda, Y., Hayashi, K. y Kuriowa, K. (2005). The application of fMRI to basic experiments in acupuncture. The effects of stimulus points and content on cerebral activities and responses. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 24(2), 47-51.

Ulloa, L., Quiroz-González, S. y Torres-Rosas, R. (2017). Nerve Stimulation: Immunomodulation and Control of Inflammation. *Trends Mol Med*. doi: 10.1016/j.molmed.2017.10.006

Van Westerloo, D. J., Giebelen, I. A., Florquin, S., Daalhuisen, J., Bruno, M. J., de Vos, A. F. y Van der Poll, T. (2005). The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis*, 191(12), 2138-2148. doi: 10.1086/430323

Van Westerloo, D. J., Giebelen, I. A., Florquin, S., Bruno, M. J., Larosa, G. J., Ulloa, L. y Van der Poll, T. (2006). The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology*, 130(6), 1822-1830. doi: 10.1053/j.gastro.2006.02.022

Vida, G., Pena, G., Deitch, E. A. y Ulloa, L. (2011). Alpha7-cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine. *J Immunol*, 186(7), 4340-4346. doi: 10.4049/jimmunol.1003722

Vida, G., Pena, G., Kanashiro, A., Thompson-Bonilla Mdel, R., Palange, D., Deitch, E. A. y Ulloa, L. (2011). beta2-Adrenoreceptors of regulatory lymphocytes are essential for vagal neuromodulation of the innate immune system. *FASEB J*, 25(12), 4476-4485. doi: 10.1096/fj.11-191007

Wang, H., Liao, H., Ochani, M., Justiniani, M., Lin, X., Yang, L. y Ulloa, L. (2004). Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med*, 10(11), 1216-1221. doi: 10.1038/nm1124

Wang, H., Wang, L., Shi, X., Qi, S., Hu, S., Tong, Z. y Litscher, G. (2015). Electroacupuncture at Zusanli Prevents Severe Scalds-Induced Gut Ischemia and Paralysis by Activating the Cholinergic Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 787393. doi: 10.1155/2015/787393

Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S. y Tracey, K. J. (2003). Nicotinic

acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421(6921), 384-388. doi: 10.1038/nature01339

Wang, S. B., Chen, S. P., Gao, Y. H., Luo, M. F., & Liu, J. L. (2008). Effects of electroacupuncture on cardiac and gastric activities in acute myocardial ischemia rats. *World J Gastroenterol*, 14(42), 6496-6502.

Willemze, R. A., Luyer, M. D., Buurman, W. A. y De Jonge, W. J. (2015). Neural reflex pathways in intestinal inflammation: hypotheses to viable therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12(6), 353-362. doi: 10.1038/nrgastro.2015.56

Yang, C. M., Chen, F. F., Sung, T. C., Hsu, H. F. y Wu, D. (1993). Pharmacological characterization of muscarinic receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Physiol*, 265(3 Pt 1), C666-673.

Zhu, M. F., Xing, X., Lei, S., Wu, J. N., Wang, L. C., Huang, L. Q. y Jiang, R. L. (2015). Electroacupuncture at Bilateral Zusanli Points (ST36) Protects Intestinal Mucosal Immune Barrier in Sepsis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 639412. doi: 10.1155/2015/639412

Zia, S., Ndoye, A., Nguyen, V. T. y Grando, S. A. (1997). Nicotine enhances expression of the alpha 3, alpha 4, alpha 5, and alpha 7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 97(3), 243-262.





Melisa Sánchez Méndez.
"Ultramar",
Mixta/papel,
25x35 cm,
2016.

EL TRÁFICO VESICULAR Y COMPAÑÍA: CAMBIANDO PERSPECTIVAS

VESICULAR TRAFFIC AND COMPANY: CHANGED PERSPECTIVES

Anayetzin Torres-Rivera¹

Fecha de recepción: 28 de noviembre de 2016

Fecha de aceptación: 10 de octubre de 2017

Resumen - A partir de la década de los ochenta, la concepción en las funciones de las vesículas celulares y las vías que transitan para comunicar a las células ha cambiado de ser meras transportadoras de desechos a ser moléculas indispensables en su desarrollo y supervivencia, al ser vehículos que transportan proteínas, lípidos y material genético que puede modificar por completo la fisiología y metabolismo de la célula receptora, lo cual abre un espectro amplio de uso en aplicaciones clínicas y terapéuticas.

Abstract - Since 80's decade, the notion about cellular vesicles functions and the mechanisms that they follow in the cell and the organism has changed, from simple waste carriers to communicating molecules essential for the development and survival of the cell. Vesicles are able to transport proteins, lipids and genetic material involved in the physiologic and metabolic transformation of the target cell, and thus, they use in clinic and therapeutic applications could bring many benefits in the future.



Palabras clave:

Vesículas extracelulares, exosomas, microvesículas, comunicación intercelular.



Keywords:

Extracellular vesicles; exosomes, microvesicles, intercellular communication.

¹ Cátedra Conacyt-Facultad de Medicina y Cirugía UABJO. Centro de investigaciones UNAM-UABJO. Correo electrónico: atorresri@conacyt.mx

En el año 2013, los investigadores Randy W. Schekman, James E. Rothman y Thomas C. Südhof obtuvieron el Premio Nobel de Medicina "por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico vesicular, el principal sistema de transporte de nuestras células", lo cual significó un gran respaldo hacia el conocimiento generado y obtenido a partir de la década de los 40 sobre las partículas y los procesos que gobiernan el tránsito y circulación de diversas moléculas al interior de las células y que sirven, además, en los procesos de comunicación intercelular, permitiendo el correcto funcionamiento de los organismos y su supervivencia (Van der Pol, Böing, Harrison, Sturk y Nieuwland, 2012; Meguías, Molist y Pombal, 2014; Szatanek, Baran, Siedlar, Baj-Krzyworzeka, 2015).

En un inicio, los estudios sobre las vesículas celulares reducían el desempeño de éstas a la remoción de desechos celulares. No obstante, en el caso de las células eucariotas, al ser compartimentalizadas, la función de las vesículas comenzó a revisarse y se encontró que ostentaban un papel fundamental en la comunicación entre cada uno de los organelos, al llevar en su interior, o incluidas en sus membranas, las moléculas que permitirían la siguiente fase del proceso celular, como es el caso del retículo endoplásmico rugoso con el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y la mitocondria o recientemente, como se ha detectado, la comunicación por vesículas entre mitocondrias con los peroxisomas (Meguías *et al.*, 2014; Sugiura, McLelland, A Fon y McBride, 2014).

Sin embargo, las rutas que siguen las vesículas y su contenido no se limitan a los orgánulos intracelulares, ya que además son capaces de hacer una trayecto exportador (exocitosis) e importador (endocitosis) a través de la membrana plasmática, que es esencial para el intercambio de biomoléculas, receptores celulares e información genética entre las células, lo cual tiene influencia sobre la fisiología, el metabolismo y la patogenia de la célula receptora, y en su conjunto conforman el mecanismo denominado tráfico vesicular (Ohno,

Ishikawa y Kuroda, 2013; Van der Pol *et al.*, 2012; Meguías *et al.*, 2014). Este descubrimiento llevó a la reinterpretación de los procesos de comunicación intercelular que anteriormente eran descritos mediante modelos de interacción directa célula-célula o de secreción de moléculas solubles requeridas para la función esperada (Van der Pol *et al.*, 2012; Raposo y Stoorvogel, 2013; Szatanek *et al.*, 2015). Ahora se sabe que el desempeño de las vesículas no se limita a la comunicación célula-célula, sino que además está implicada en la señalización celular, la presentación de antígeno, en la inmunosupresión, en la propagación de los agentes infecciosos, en la adhesión celular y la coagulación, en la integridad y función vascular, así como en la angiogénesis, desarrollo y metástasis de células cancerosas (Van der Pol *et al.*, 2012).

Es la variedad de funciones descubiertas para las vesículas celulares la que ha generado un cambio en el panorama acerca de su importancia y aplicabilidad para el estudio y entendimiento de diversas patologías; además de abrir nuevas posibilidades en el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades (Minciocchi, Freeman y Di Vizio, 2015; Ohno *et al.*, 2013; Raposo y Stoorvogel, 2013; Szatanek *et al.*, 2015; Van der Pol *et al.*, 2012).

Un primer abordaje dentro del estudio del tráfico vesicular es la determinación de la variedad de vesículas que la célula forma para su exportación, de tal manera que se ha clasificado más de una decena de ellas usando como criterios su biogénesis, el tamaño, la densidad, el contenido molecular (proteico o de ácidos nucleicos), las proteínas de superficie e inclusive las diversas metodologías empleadas actualmente para aislarlas. Lo anterior ha generado una nomenclatura muy diversa que las designa como micropartículas, microvesículas, exosomas, ectosomas, dexosomas, prostasomas, exovesículas, nanovesículas, oncosomas, entre otras. En muchas ocasiones dichos nombres describen al mismo tipo de partícula, por lo que actualmente todas se engloban bajo el término

simplificado de "vesículas extracelulares", a fin de evitar confusiones en el intercambio de información en las diversas investigaciones, ya que hasta el momento no existe un consenso para agruparlas debido a que el tamaño de muchas de ellas se superponen, comparten moléculas de superficie (como las tetraspaninas; Minciacchi *et al.*, 2015) o en algunos casos tienen el mismo origen: la liberación a partir de la membrana plasmática (Minciacchi *et al.*, 2015; Raposo y Stoorvogel, 2013; Van der Pol, Böing, Gool y Nieuwland, 2016). Mención aparte merecen los cuerpos apoptóticos que, si bien se originan como prolongaciones de la membrana plasmática y tienen tamaños similares a varios tipos de vesículas extracelulares, los mecanismos de creación y los estímulos que los activan son diferentes a los vesiculares y no serán abordados en esta revisión.

A pesar de esta gama, el estudio de las vesículas extracelulares se ha enfocado principalmente en dos variedades de partículas: las microvesículas y los exosomas, debido sobre todo a su aplicabilidad en el estudio de diversas enfermedades y a la forma en que son aisladas e identificadas (Ohno *et al.*, 2013; Raposo y Stoorvogel, 2013; Szatanek *et al.*, 2015; Van der Pol *et al.*, 2012).

Los exosomas son partículas muy pequeñas, de un diámetro aproximado de 30 a 100 nm, con una densidad aproximada de 1.13 a 1.19 g/mL medido en un gradiente de sacarosa. Surgen por invaginación en las vesículas intraluminales localizadas dentro de los cuerpos multivesiculares. Dichas estructuras forman parte del Complejo de Clasificación Endosómica Requerido para el Transporte (o ESCRT, por sus siglas en inglés), que es el responsable de liberar a los exosomas y además de aportarle proteínas como Alix y TSG101 (tumor susceptibility gene 101). Además, por su origen endosomal, los exosomas enriquecen su superficie con proteínas como flotilina, anexinas y tetraspaninas (CD63, CD9, CD81), las cuales sirven como moléculas identificadoras junto con algunas proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90) y las del ESCRT.

Los exosomas son generalmente aislados por ultracentrifugación, usando velocidades de 10 000 a 200 000 g (Raposo y Stoorvogel, 2013; Szatanek *et al.*, 2015; Van der Pol *et al.*, 2012; Van der Pol *et al.*, 2016).

Las microvesículas, conocidas también como micropartículas, ectosomas o vesículas de mudanza, son partículas con un diámetro promedio de 100 a 1000 nm que se generan directamente en la membrana plasmática a partir de brotes salientes específicos provocados por la activación de la célula, en respuesta a un estímulo exterior (Ohno *et al.*, 2013). Su mecanismo de formación supone que después de que la célula ha sido activada por un estímulo, por ejemplo la oxidación de componentes celulares por especies reactivas de oxígeno/nitrógeno y radicales, o la liberación de citocinas o endotoxinas, la concentración de calcio en el citosol se incrementa, permitiendo la activación de diversas enzimas (como las calpaínas y las cinasas) y la inhibición de otras (como las fosfatasa y las traslocasas), que dan paso a la remodelación del citoesqueleto, lo que se traduce en una asimetría de la membrana que provocará una ampolla o burbuja de la que se desprenderá la microvesícula en cuestión. Este tipo de vesículas extracelulares son ricas en integrinas, selectinas y tetraspaninas específicas de la célula origen.

Por su variabilidad, la densidad de las microvesículas es desconocida y suelen aislarse por centrifugación en un intervalo de 10 000 a 20 000 g (Raposo y Stoorvogel, 2013; Szatanek *et al.*, 2015; Van der Pol *et al.*, 2012; Van der Pol *et al.*, 2016).

A pesar de que la centrifugación a diferentes velocidades o los gradientes de sacarosa han sido las técnicas más usadas en los laboratorios de investigación para el estudio de las vesículas extracelulares, existen otras metodologías empleadas para su aislamiento, como la inmunoafinidad usando anticuerpos monoclonales embebidos en perlas magnéticas, columnas de exclusión molecular o la precipitación polimérica (Raposo y Stoorvogel, 2013; Szatanek *et al.*, 2015; Van der Pol *et al.*, 2012; Van der Pol *et al.*, 2016; Witwer, Buzás, Bemis, Bora, Lässer,

Lötvall, Nolte-t Hoen, Piper, Sivaraman, Skog, Théry, Wauben y Hochberg, 2013).

Mención aparte merecen los métodos de identificación de vesículas extracelulares, los cuales también representan un reto en la estandarización y la futura aplicabilidad de las vesículas en terapias o diagnósticos. Las técnicas empleadas son una combinación entre citometría de flujo, rastreo de nanopartículas, western blot, microscopía electrónica, espectroscopia de Raman e inclusive la microscopía de fuerza atómica, con los que se pretende conocer el tamaño, la concentración, la integridad y el origen de las vesículas extracelulares (Raposo y Stoorvogel, 2013; Szatunek *et al.*, 2015; Van der Pol *et al.*, 2012; Van der Pol *et al.*, 2016; Witwer *et al.*, 2013).

Un segundo abordaje en el estudio del tráfico vesicular consiste en obtener y reconocer el contenido de las vesículas extracelulares, con la finalidad de entender el impacto que puede tener este cargamento en la célula receptora. Los estudios de proteómica, metabolómica y genómica demuestran que es altamente heterogéneo, que puede incluir proteínas de superficie o citosólicas, ácidos nucleicos y lípidos. Dicho contenido está claramente influenciado por el tipo celular, la condición fisiológica o patológica y el tipo de estímulo que genera y libera a la vesícula extracelular; por ejemplo, se sabe que estas vesículas secretadas en algunos carcinomas llevan microARN o ARN de interferencia que favorecen la angiogénesis y metástasis. También se han observado vesículas extracelulares de células cancerosas que participan en la transferencia de proteínas oncogénicas a células sanas, como es el caso del receptor EGFRvIII, transferido directamente de las vesículas extracelulares derivadas del tumor hacia las células blanco. Están, además, las involucradas en la supresión de la respuesta inmune al inactivar linfocitos T y células Natural Killers mediante el factor TGF β 1 contenido en exosomas de tumor, o las que participan en la regulación de la diferenciación de los linfocitos T y células mieloides. El contenido vesicular también ha sido estudiado en la acumulación

de placas amiloides en el Alzheimer por acción de β -secretasas localizadas en exosomas, así como en la hipótesis del "exosoma de Troja", donde miARNs del contenido vesicular coadyuvan en la actividad invasiva y de replicación de varios retrovirus como el HIV, en el herpesvirus tipo 6, el virus de hepatitis C y el virus de Epstein-Barr. Inclusive, ahora se postula a los exosomas como un posible mecanismo de dispersión de priones de células infectadas del tracto gastrointestinal hacia otras del sistema nervioso (Minciacchi *et al.*, 2015; Ohno *et al.*, 2013; Van der Pol *et al.*, 2012). La información sobre el contenido vesicular en proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos se encuentra reunida en dos principales bases de datos: Exocarta y Vesiclepedia (Kalra *et al.*, 2012; Keerthikumar *et al.*, 2015).

Es importante hacer notar que los cambios en la cantidad liberada de microvesículas y/o exosomas respecto de controles también representa un posible marcador de enfermedad, independientemente del contenido que lleven. Lo anterior se ha mostrado en algunos estudios sobre vesículas extracelulares en entidades patológicas como el cáncer de próstata o la preeclampsia, en los que se ha reportado un incremento en el número dichas vesículas; pero los resultados revelaron que la cantidad de vesículas extracelulares en muestras de pacientes no sólo son un marcador de inicio, sino también sirven para determinar la progresión de la enfermedad, ya que su presencia y concentración constituyen en sí una diferencia en dos momentos distintos de la célula (Ohno *et al.*, 2013; Van der Pol *et al.*, 2012).

Asimismo, es indispensable resaltar que las vesículas extracelulares, al ser moléculas que se secretan, han podido ser aisladas de diversos fluidos corporales, como sangre, orina, ascitis, saliva, líquido cefalorraquídeo, semen, líquido amniótico, bilis, etcétera, lo que las hace potenciales blancos terapéuticos o marcadores diagnósticos, lo cual representa un reto, pues cada fluido presenta características especiales a considerar en el momento del aislamiento de las vesículas, las cuales podrían contaminarse con otras partículas propias del

fluido (como las LDL o HDL) o agregados proteicos u obtener poca muestra por el reducido volumen que se produce en el cuerpo (Raposo y Stoorvogel, 2013; Van der Pol *et al.*, 2012; Witwer *et al.*, 2013).

A pesar de los múltiples estudios que en las últimas tres décadas se han hecho acerca del tráfico vesicular y las vesículas extracelulares, existen muchos aspectos sobre la función fisiológica, el papel en la patología de diversas enfermedades y en los mecanismos moleculares que gobiernan que no han sido dilucidados. Es seguro que no se han identificado completamente todas las funciones que pueden ejercer las vesículas extracelulares, para lo cual será indispensable mejorar y estandarizar las metodologías de aislamiento y caracterización, así como lograr un consenso en la nomenclatura de las mismas que favorezca la comparación de los resultados de los diferentes estudios (Raposo y Stoorvogel, 2013; Szatunek *et al.*, 2015; Van der Pol *et al.*, 2012; Witwer *et al.*, 2013).

Bibliografía

Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V. C., Borrás, F. E. *et al.* (2012). Vesiclepedia: A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biology*, 10(12), e1001450. Recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>

Keerthikumar, S., Chisanga, D., Ariyaratne, D., Al Saffar, H., Anand, S., Zhao, K., Samuel, M., Pathan, M., Jois, M., Chilamkurti, N., Gangoda, L. y Mathivanan, S. (2015). ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 688-692.

Meguías, M., Molist, P. y Pombal, M. A. (2014). *Atlas de Histología vegetal y animal: Tráfico vesicular*. Universidad de Vigo: Facultad de Biología. Recuperado de <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/5-trafico.php>

Minciacchi, V. R., Freeman, M. R. y Di Vizio, D. (2015). Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles

and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 40, 41-51.

Ohno, S., Ishikawa, A. y Kuroda, M. (2013). Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 65(3), 398-401.

Raposo, G. y Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.*, 200(4), 373-383.

Sugiura, A., McLelland, G., A Fon, E. y McBride, H. (2014). A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO Journal*, 33(19), 2143-2156.

Szatunek, R., Baran, J., Siedlar, M., Baj-Krzyworzeka, M. (2015). Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *International J. Mol. Med.*, 36(1), 11-17.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2013. Recuperado de https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2013/

VanDer Pol, E., Böing, A., Harrison, P., Sturk, A. y Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of Extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64, 676-704.

Van Der Pol, E., Böing, A. N., Gool, E. L. y Nieuwland, R. (2016). Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost.*, 14(1), 48-56.

Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte-'t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H. y Hochberg, F. (2013). Standardization of simple collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracellular Vesicles*, 2, 20360-20385.



Melisa Sánchez Méndez.
"Prusia",
Mixta/papel,
25x35 cm,
2016.

LOS VIRUS COMO DETONANTE ONCOGÉNICO

THE VIRUSES AS ONCOGENIC DETONANT

Jael López Martínez,^{1*} María del Pilar Gabriel de la Torre,² Cristian Cruz Ochoa,³
Lucía Martínez Martínez⁴ y Miguel Ángel Mayoral Chávez⁵

Fecha de recepción: 30 de noviembre de 2016

Fecha de aceptación: 30 de agosto de 2017

Resumen - Los virus son patógenos intracelulares que se reproducen dentro de una célula utilizando la maquinaria de la misma para obtener más partículas virales. La replicación viral puede afectar genes celulares normales del hospedador, modulando así las vías de señalización que controlan la proliferación, diferenciación, muerte celular, integridad genómica y el reconocimiento mediado por el sistema inmune. Aproximadamente 20% de los cánceres en humanos son causados por virus, conocidos como virus oncogénicos.

El fenómeno que lleva de una infección básica viral a la tumorigénesis es largo, debido a la participación de factores como la complicación inmunitaria, mutaciones celulares y la exposición a otros agentes cancerosos. El virus de Epstein-Barr (EBV), sarcoma de Kaposi- asociado a herpes, también conocido como Herpes virus tipo 8 (HHV-8), virus de papiloma humano (HPV), el virus de la hepatitis B (HBV), el de la hepatitis C (HCV) y el virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1) están involucrados con el desarrollo de cáncer en humanos.



Palabras clave:

Oncogénesis, virus, oncogenes, genes supresores tumorales.

Abstract - Viruses are intracellular pathogens, which are replicated within a cell, using their own machinery to generate more viral particles. Viral replication can affect normal host cell genes, thereby modulating signaling pathways that control cell proliferation, differentiation, and death; genomic integrity, and immune-mediated recognition. Viruses, known as oncogenic viruses, cause about 20% of human cancers.

The phenomenon of a basic viral infection to tumorigenesis is long due to the involvement of several factors, such as immune complications, cellular mutations, and exposure to other cancer agents. Epstein-Barr virus (EBV), Kaposi's sarcoma-associated with herpes, also known as type-8 Herpes virus (HHV-8), human papillomaviruses (HPV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and type-1 human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1) are involved in the development of humans cancers.



Keywords:

Oncogenesis, viruses, oncogenes, tumor suppressor genes.

¹ Laboratorio de Inmunopatología Molecular, Centro de Investigación UNAM-UABJO, Facultad de Medicina y Cirugía, UABJO.

² Laboratorio de Patobiología Celular y Molecular, Centro de Investigación UNAM-UABJO, Facultad de Medicina y Cirugía, UABJO.

³ Facultad de Medicina y Cirugía, UABJO.

⁴ Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación, Facultad de Medicina UNAM-UABJO.

⁵ Laboratorio de Neurobiología, Centro de Investigación UNAM-UABJO, Facultad de Medicina y Cirugía, UABJO.

* Correo electrónico: jlópez.cat@uabjo.mx

La oncogénesis es una transformación celular hereditaria que da como resultado el cáncer y puede asociarse a la presencia de ciertos virus conocidos como oncogénicos, los cuales pueden dividirse en distintos grupos, según su material genético de ADN o de ARN. A su vez, los virus de ADN se clasifican en virus de ADN bicatenario y virus de ADN monocatenario. Por su parte, los virus de ARN se pueden catalogar en virus de ARN monocatenario con sentido positivo, virus de ARN bicatenario con sentido negativo, virus de ARN monocatenario retrotranscrito y virus de ARN bicatenario retrotranscrito (Sxevik, 2012; Zheng, 2010).

Existe un grupo de virus que se asocia al desarrollo de cáncer, tales como el de Epstein-Barr (EBV), sarcoma de Kaposi- asociado a herpes, también conocido como Herpes virus tipo 8 (HHV-8), virus de papiloma humano (HPV), el virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la hepatitis C (HCV) y el virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1), entre otros (Bouvard, Baan, Straif, Grosse, Secretan, El Ghissassi, Benbrahim, Guha, Freeman, Galichet y Cogliano, 2009).

Los virus per se no son capaces de desarrollar tumores, sino que otros factores como la inflamación crónica, mutágenos y la inmunosupresión también están implicados en el desarrollo del cáncer (Parkin, 2006; Aoki, Jaffe, Chang, Jones, Teruya-Feldstein, Moore y Tosato, 1999).

De los 14 millones de casos nuevos de cáncer en el mundo en 2012, alrededor de 2.2 millones (15.4%) se atribuyeron a agentes infecciosos; la mayoría de las incidencias de cáncer asociado a infección (dos terceras partes) ocurrió en países con menor índice de desarrollo (Plummer, De Martel, Vignat, Ferlay, Bray y Franceschi, 2016).

En todo el mundo, más de 50% de las causas asociadas a cáncer son prevenibles, incluyendo las infecciosas (Colditz, Wolin y Gehlert, 2012).

Inflamación y virus oncogénicos

Los virus oncogénicos tienden a establecer infecciones persistentes a largo plazo. La inflamación es parte

importante de la progresión tumoral, pues es una respuesta benéfica que comienza cuando el tejido dañado secreta sustancias químicas que inducen a la activación de las células blancas del tejido sanguíneo, mismas que segregan citoquinas que señalan la localización de las células para dividir y reconstruir el tejido dañado. Una vez que el tejido dañado es reconstruido, el proceso inflamatorio termina. Sin embargo, en los casos de inflamación crónica los procesos continúan, independientemente de si hay daño o recuperación. El incremento de daño genómico, de la síntesis de ADN, de la proliferación celular, de la interrupción de las vías de reparación del ADN, la inhibición de la apoptosis y la promoción e invasión por la angiogénesis también está asociada a la inflamación crónica y pueden facilitar la progresión tumoral (Coussens y Zena 2002; Hofseth y Ying, 2006). El uso de antiinflamatorios no esteroideos puede reducir el riesgo de padecer cáncer, o al menos modificar la conducta agresiva hacia desarrollarlo (Yan, Anderson, DeWitte y Nakada, 2006; De Groot, De Vries, Groen y De Jong, 2007).

Los mutágenos asociados al cáncer

Los antecedentes genéticos, la cantidad y duración de la exposición a mutágenos presentes en el ambiente como la radiación ultravioleta (dependiente del estilo de vida), los contaminantes en el aire (como SO₂, partículas de tabaco, emisiones de productos de combustión que incluyen compuestos orgánicos, óxidos de nitrógeno, partículas finas, adicionalmente el incremento de ozono, entre otros), en el suelo (herbicidas), en el agua (arsénico, cloración) y en la comida pueden ser causantes de cáncer. Comprender cómo estos factores y cómo al estar expuestos a ellos conduce al desarrollo de la enfermedad es posible que ayude a prevenirla (Stewart, 2008; Boffettay Nyberg, 2003).

El sistema inmune y los tumores

Los tumores no solamente pueden sobrevivir y diseminarse, también pueden imitar algunas vías de señalización del sistema inmune para propagar las

condiciones que favorecen la tolerancia de éste hacia ellos. La tolerancia a antígenos tumorales puede ocurrir debido a su persistencia, a la baja regulación del complejo mayor histocompatibilidad o a la presencia de células T reguladoras antígeno específicos (Zou, 2005; Ghirelli y Hagemann, 2013).

Oncogenes virales

Los oncogenes virales desempeñan un papel crucial en la proliferación descontrolada de las células del hospedador y codifican para la síntesis de proteínas virales que conducen a la transformación (Judson, 1994).

Los protooncogenes de la célula son contrarios a los oncogenes virales, los cuales son convertidos a un estado oncogénico por mutaciones somáticas (Croce, 2008). Dichas mutaciones somáticas en el genoma celular pueden incluir distintas clases de cambios de secuencias, de las que éstas incluyen sustitución por una o varias bases, inserciones o deleciones de pequeños o largos segmentos; la ruptura de ADN del genoma genera un incremento del número de copias de genes (amplificación de genes) o su reducción, resultando en la completa ausencia de secuencias de ADN (Litwin, Clarke, Dean y Wentzensen, 2017).

Los oncogenes persistentemente luchan con los genes supresores tumorales (protegen al ADN y controlan las actividades celulares), pero en el caso del desarrollo del cáncer, estos últimos pierden la lucha o los oncogenes virales prevalecen, causando inactivación de los genes supresores de tumores (Yokota, 2000).

La mayoría de los virus oncogénicos en humanos codifican para proteínas que específicamente tienen como objetivo genes que codifican para proteínas celulares que controlan la progresión del ciclo celular y la apoptosis; por ejemplo, p53 y la proteína del retinoblastoma pRb, lo que conduce a una pérdida significativa de la supresión tumoral y al desarrollo del cáncer (Levine, 2009; Shackelford y Pagano, 2004).

El cáncer asociado a virus es ocasionado por la presencia de oncogenes virales (v-onc), activación de

protooncogenes celulares, transformaciones celulares, desregulación del ciclo celular e inactivación de supresores tumorales. Los oncogenes virales derivan de los protooncogenes celulares; los productos de los oncogenes pueden ser clasificados como factores de crecimiento, receptores para factores de crecimiento, factores de transcripción, transductores de señales y reguladores de la apoptosis. Tanto los oncogenes celulares como los virales están vinculados a la aparición del cáncer (Croce, 2008).

Los virus pueden causar metilación del genoma de la célula hospedadora, conduciendo al silenciamiento de genes del genoma; también tienen la capacidad de alterar la actividad de las proteínas conocidas como histonas, remodelando la cromatina (Fraga y Esteller, 2005).

Un paso fundamental para la transformación oncogénica es que los virus integran su información genética en el material genético de la célula hospedadora, causando mutaciones, rearrreglos cromosómicos y falla en el control de la división celular, interfiriendo con las vías de señalización mitógenicas y el proceso del ciclo celular.

La transformación, más allá de hacerlas inmortales, las pone en un estado de crecimiento indefinido. Los virus de ADN insertan directamente su genoma en el de la célula hospedadora, causando neoplasias; mientras que los virus de ARN tienen que sintetizar ADN mediante transcripción inversa antes de realizar esa misma operación. La interrupción de la regulación del metabolismo a través de la integración del genoma viral en el genoma hospedero es el motivo principal de la transformación (Emmett, Dove, Mahoney, Wurm y Hiscox, 2005).

El ciclo celular y la apoptosis

El ciclo celular está compuesto por una serie de eventos estrictamente regulados por factores internos y externos, e incluye puntos de control que aseguran su progreso normal. Varias proteínas controlan la transición de una fase a la siguiente durante el ciclo celular, las principales son las ciclinas y las cinasas,

dependientes de ciclinas (CDK), las cuales regulan de manera positiva el avance del ciclo celular. Dicho ciclo también está regulado de manera negativa por los inhibidores de los complejos CDK-ciclina (CDKi), de esta manera se asegura que la replicación y la segregación cromosómica se lleven a cabo correctamente para mantener al organismo en homeostasis (Bagga y Bouchard, 2014).

La apoptosis es un proceso altamente selectivo, muy importante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas; este mecanismo mantiene la homeostasis y su desregulación lleva a una ilimitada proliferación y transformación de células. En el cáncer hay una pérdida entre el balance de células muertas y las que deberían estarlo, y que no reciben las señales suficientes para hacerlo. Los virus oncogénicos inhiben de diferentes formas los procesos apoptóticos, permitiendo la propagación de las células dañadas e infectadas. Durante este proceso algunas proteínas virales pueden evadir el sistema inmune, mientras otras pueden interactuar directamente con las caspasas involucradas en la señalización apoptótica. En algunas ocasiones, los virus promueven la apoptosis, lo cual es necesario para una regulación exacta en las etapas iniciales de la infección (Fuentes-González, Contreras, Manzo y Lizano, 2013).

Los virus han desarrollado muchas estrategias para derrotar al sistema regulatorio de las células infectadas. Los virus oncogénicos incrementan o disminuyen los efectos regulatorios de las proteínas que controlan el ciclo celular y arrestan a las células mutadas en la fase del ciclo que induce replicación del ADN.

Los genes supresores tumorales protegen a las células de la transformación maligna, instruyéndolas, previniendo el crecimiento y la división celular. Las oncoproteínas virales interfieren con los genes supresores de tumores, causando desregulación del crecimiento celular y proliferación celular desmedida. El supresor tumoral p53, por ejemplo, es fundamental en la regulación de los procesos celulares, incluyendo la detención del ciclo, apoptosis y senescencia (Bauer y Helfand, 2006).

El HBV codifica para la oncoproteína antígeno-X (HBx), que bloquea la apoptosis mediada por p53. El HCV contiene una proteína no estructural, 5A (NS5A), que interfiere con la unión de p53 al ADN (Bouchard y Schneider, 2004).

La pRb es una proteína reguladora negativa del ciclo celular. La oncoproteína E7 del HPV interfiere con la unión del pRb al factor de transcripción E2F. El efecto biológico de E7 es incrementar la transcripción de proteínas asociadas a la síntesis de ADN, a la autofagia y la inhibición de la señalización mediada por interferón. El estudio molecular del cáncer vinculado a virus juega un papel relevante en el avance del conocimiento de la biología de estos procesos neoplásicos.

La oncogénesis reúne varias características muy particulares, como proliferación celular continua, desregulación energética celular, inestabilidad genómica, inducción de la angiogénesis, invasión inmune y metástasis.

Oncovirus de ADN

Los virus de ADN son EBV, HPV, HHV-8 y MCV (polioma virus de células Merkerl) (Elgui de Oliveira, 2007). Estos oncovirus, en células permisivas, pueden replicarse viralmente, causando muerte y lisis celular, o bien, en células no permisivas integran su genoma de ADN en el genoma de la célula hospedadora. El ADN que integran estos oncovirus codifica para proteínas que pueden detener a las proteínas reguladoras del ciclo celular, principalmente al p53 y a pRb (Knudson 1971).

Las células hospedadoras transformadas expresan proteínas con posibilidad de facilitar la síntesis de ADN viral y de la propia célula.

Virus del papiloma humano (VPH)

En 2012, de los 2.2 millones de casos nuevos de cáncer en el mundo asociados a una infección, 29.5% correspondió a infección por VPH, siendo uno de los principales agentes infecciosos relacionados con el desarrollo del cáncer. El VPH se relaciona 100% con el cáncer cervical (Plummer *et al.*, 2016), mismo que

es la cuarta causa de muerte en mujeres alrededor del mundo y la segunda en mujeres entre los 14 y 44 años (Bailey, Chuang, DuPont, Eng, Foxhall, Merrill, Wollins y Blanke, 2016)

Estos virus tienen un genoma de ADN de doble cadena, circular, sin envoltura y su tamaño es de 8kb. Codifica para tres oncogenes: E5, E6 y E7, que regulan los procesos de transformación, dos proteínas reguladoras E1 y E2, responsables de la transcripción y la replicación, y dos proteínas estructurales L1 y L2, que componen la cápside viral (K Munger, 2002). Pertenece a la familia papillomaviridae, infecta a las células de la mucosa epitelial, provocando cáncer de células epiteliales. Se han descubierto 130 tipos de VPH, algunos de los cuales se asocian con cáncer cervical en humanos y se les conoce como virus de alto riesgo. En la infección por VPH, 90% de los casos son asintomáticos y la infección desaparece espontáneamente después de uno o dos años, se considera la enfermedad de transmisión sexual más común. Se estima que hay 0.5 millones de casos al año de cánceres vinculados a infección por VPH de alto riesgo; es el responsable de la aparición de verrugas en el cérvix uterino, boca, ano, pene y orofaringe.

Los VPH de alto riesgo VPH-16 y VPH-18 dan lugar a carcinogénesis, ya que sus oncoproteínas E6 y E7 participan promoviendo inestabilidad genómica, particularmente en células epiteliales (Duensing y Münger, 2002).

Los VPH de bajo riesgo VPH-6 y VPH-11 afectan la mucosa anogenital, provocando hiperplasia epitelial. Aproximadamente, 5% de los cánceres humanos son causados por infecciones de VPH. El comportamiento oncogénico del VPH se vincula con varias mutaciones de genes, incluyendo p53, IL-10, receptor del ácido retinoico y antígenos leucocitarios humanos (Madkan, Cook-Norris, Steadman, Arora, Mendoza y Tyring, 2007).

Desde su descubrimiento, en 1907, se han tomado medidas para evitar el desarrollo de cáncer asociado a VPH. La prueba de rutina, el papanicolaou, proporciona información acerca de la infección por VPH y el

surgimiento de cáncer cervical. Más recientemente se han formulado las vacunas contra VPH de alto riesgo (VPH18 y VPH16), las cuales son altamente efectivas (Lowy y Schiller, 2012).

Virus de Epstein Bar (EBV)

El EBV, también conocido como herpes virus humano-4 (HHV-4), es un virus grande de ADN de doble cadena, que infecta linfocitos B y células epiteliales.

En el mundo, más de 95% de la población está infectada con EBV, que usualmente ocurre en la infancia, siendo asintomático. En la adolescencia, la infección por EBV se asocia a la mononucleosis infecciosa. En el caso de la infección por EBV en adultos, en algunos casos relaciona con el linfoma tipo no Hodgking, linfoma de Burkitt, carcinoma gástrico y linfoma de células T (Iizasa, 2012; Cho, 2016).

El genoma del EBV puede existir en dos estados diferentes dentro de las células hospedadoras, lítico y de latencia; ambas fases del ciclo de reproducción del EBV se asocian con enfermedad. El EBV puede immortalizar a los linfocitos B y conducir al establecimiento de carcinogénesis. El genoma viral codifica para proteínas de latencia de membrana-1 (LMP-1), que tiene un alto potencial oncogénico, los múltiples dominios carboxi-terminales de LMP-1 imitan al receptor CD40, de la familia de necrosis tumoral, e inducen varias vías de señalización de transducción de señal que resultan en proliferación celular. A través de NF- κ B provee señales de supervivencia a los miembros de la familia Bcl-2, también regula la expresión de numerosas proteínas antiapoptóticas y del factor de crecimiento de fibroblastos-2 (Young, 2004; Rowe, Peng-Pilon, Huen, Hardy, Croom-Carter, Lundgren y Rickinson, 1994).

El genoma del EBV codifica para un RNA pequeño (EBER) que provoca hipermetilación y amplificación del gen de la Janus quinasa-2 (Genitsch, Novotny, Seiler, Kröll, Walch y Langer, 2015). En algunos pacientes, la infección por EBV conduce a un estado de latencia que libera algunas proteínas, como el antígeno nuclear del EBV-1 (EBNA-1), LMP-1. EBNA-1 es una proteína

que se expresa en todos los tipos de cáncer asociado a EBV, ayuda a mantener la forma episomal del virus, la replicación y la transformación. Asimismo, lleva a inestabilidad genómica, actuando como un oncogén (Gruhne, Sompallae, Marescotti, Kamranvar, Gastaldello y Masucci, 2009).

La expresión de EBNA-2 induce la desregulación del protooncogen c-myc, causando así un incremento de la proliferación celular.

Virus de hepatitis B (HBV)

Los virus de la HBV tienen un genoma circular de ADN, parcialmente de doble cadena, con cuatro marcos de lectura abierto (ORF's) que codifican para la envoltura (pre S/S), core (pre C/C), la polimerasa y la proteína X (Seeger y Mason, 2000).

Como los retrovirus, la replicación del HBV es dependiente de una transcripción reversa; pero a diferencia de los retrovirus, la integración de su genoma en la célula hospedadora no es necesaria para la replicación viral y le permite ser resistente. Sin embargo, la integración del genoma viral al genoma de la célula hospedadora es un prerrequisito necesario para la progresión a la malignidad. Los eventos de integración del genoma viral originan deleciones cromosomales y transposiciones de las secuencias del cromosoma viral, además de inestabilidad genómica, así como la activación de protooncogenes, y son causa de carcinoma hepatocelular (HCC). El HBV es altamente contagioso, puede transmitirse por vía parenteral, sexual, sanguínea, perinatal y percutánea. La infección por HBV generalmente es asintomática en adultos, mientras que en neonatos, niños y jóvenes puede llegar a ser crónica (Tamori, Yamanishi, Kawashima, Kanehisa, Enomoto, Tanaka, Kubo, Shiomi y Nishiguchi, 2005).

De acuerdo con los datos provistos por la Organización Mundial de la Salud, alrededor de 2 millones de personas en la Tierra han sido infectadas con este virus y 350 millones de ellas

viven con infección crónica asociada a HBV. Éste es el mayor factor etiológico para desarrollar HCC, de 15 a 40% de los individuos infectados con hepatitis crónica activa pueden padecer cirrosis, falla hepática o HCC (Lok, 2004).

El virus de HBV, al integrar su genoma en la célula hospedadora, causa mutaciones que aceleran la inflamación del hígado. Su mecanismo patológico aún no se encuentra completamente comprendido; ninguna de las proteínas del HBV se ha relacionado directamente con la actividad oncogénica (Guidotti y Chisari, 2006).

El desarrollo de carcinogénesis relacionado con HBV se acelera por la exposición a carcinógenos ambientales, como la aflatoxina B, humo de cigarro y alcohol. La hepatitis crónica activa se caracteriza por necrosis de las células del hígado, inflamación y fibrosis, y se cree que el resultado de la cirrosis eventualmente tiene la capacidad de llevar al desarrollo del HCC, debido a la rápida regeneración de los hepatocitos, seguido de la constante necrosis que puede originar la acumulación de mutaciones y la subsecuente selección de células con fenotipo carcinógeno (Kajiya, Hamasaki, Nakata, Miyazoe, Takeda, Higashi, Ohkubo, Ichikawa, Nakao, Kato y Eguchi, 2001).

HBV codifica para el antígeno X (HBx), un factor de transcripción activador de los genes de la célula hospedadora; activa específicamente ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas, la vía JAK/STAT, estimula señales de transducción de la vía MAPK/ERK y sobreexpone la expresión de los genes c-myc, conduciendo a la carcinogénesis hepática debido a la interrupción de los genes supresores tumorales. Aunque solo HBx no puede ser el causante de la carcinogénesis, únicamente puede actuar como un inductor de HCC. HBx ocasiona supresión del p53, que promueve la inactivación de pRb y una baja regulación de los inhibidores del CDK (Chami, Ferrari, Nicotera, Paterlini-Bréchet y Rizzuto, 2003).

Sarcoma de Kaposi- asociado a herpes o Herpes virus tipo 8 (HHV-8)

El genoma del HHV-8 es un virus de ADN de doble hebra, puede provocar infecciones líticas o latentes. Infecta a los linfocitos B, células endoteliales y monocitos. También puede causar linfoma de efusión primario (PEL), sarcoma de Kaposi (KS) y la enfermedad de Castleman (MCD). Su mecanismo de transmisión es por vía sexual o por vía parenteral (Sullivan, Dezube y Koon, 2006).

Las infecciones causadas por HHV-8 frecuentemente son asintomáticas, pero cuando infecta con el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1) conduce al desarrollo del KS (Ganem D., 2006).

El potencial neoplásico del HHV-8 se observa especialmente en individuos inmunocomprometidos; estudios epidemiológicos ligan al HHV-8 con oncogénesis. El HHV-8 transforma células epiteliales y se ha identificado que codifica genes responsables de la transformación, proliferación, supervivencia y transformación mediada por proteínas de latencia expresadas por el virus junto con un mecanismo paracrino que ejerce directamente o indirectamente las v-citoquinas expresadas durante la fase lítica y el receptor acoplado a proteína G.

La proteína nuclear asociada a latencia (LANA) codificada por HHV-8 participa en el mantenimiento del episoma durante el periodo de latencia, también liga el episoma al cromosoma de la célula hospedadora y une los elementos de repetición virales al genoma viral para mediar su replicación. Las interacciones entre LANA y las proteínas celulares y virales, tales como p53, pRb y quinasa glucógeno sintasa- 3b (GSK-3b), conducen a proliferación celular (Mariggiò, Koch, Zhang, Weidner-Glunde, Rückert, Kati, Santag y Schulz, 2017).

La interacción de GSK-3b incrementa los niveles de betacatenina que progresa a tumores. La inactivación de p53 y pRb impide la detención del ciclo celular y causa proliferación descontrolada (Fujimuro, Wu, ApRhys, Kajumbula, Young, , Hayward y Hayward, 2003). LANA también activa la expresión de la

transcriptasa reversa telomerasa humana, que da como resultado proliferación ilimitada (Verma, Borah y Robertson, 2004).

Oncovirus de ARN

Entre los virus de ARN o retrovirus, el HCV y el HTLV-1 se relacionan con el desarrollo de carcinogénesis. Éstos tienen diferentes mecanismos oncogénicos, en alguno de los casos la sobreproducción de material oncogénico estimula la proliferación celular, mientras que en otros los virus integran su genoma cerca de genes que activan el crecimiento celular.

Algunos virus tienen proteína Tax que incentiva la expresión de genes celulares, promoviendo la transformación oncogénica a través de la interrupción y divisiones no controladas (Sxevik M, 2012).

Virus de hepatitis C (HCV)

El genoma del HCV es de cadena simple de 9.6 Kb, es un virus de ARN e infecta aproximadamente a 2% de la población. La infección con HCV se asocia con hepatitis, esteatosis hepática, cirrosis y HCC (Poynard, Man-Fung, Vlad y Ching, 2003).

Se considera que el HCV tiene un papel muy importante en la generación del HCC, que es el quinto tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial y la tercera causa de muerte (De Martel, Ferlay, Franceschi, Vignat, Bray, Forman y Plummer, 2012).

La infección por HCV se puede transmitir por transfusión sanguínea, trasplante de órganos y por fluidos de la sangre. Sus proteínas no estructurales, como NS5, pueden interrumpir las señales de control de proliferación celular. NS5A es una fosfoproteína que le confiere resistencia al interferón, incrementa la eficacia de la replicación viral y participa en el ensamble viral; NS5B es una RNA polimerasa dependiente de ARN, fundamental para la replicación del genoma de HCV. La infección por HCV causa inflamación y fibrosis que puede progresar a cirrosis y, por último, al desarrollo de cáncer. Además, las proteínas de HCV pueden inactivar a los supresores tumorales, como a p53 y pRb. El HCV

causa inestabilidad genómica (Munakata, Nakamura, Liang, Li y Lemon, 2005).

NS3 y NS5A reprimen la transcripción de p21 por modulación de la actividad de p53, mientras que NS5A causa perturbación de la regulación del ciclo celular, supresión de la respuesta inmune, inactivación de supresores tumorales y pérdida de la apoptosis, por lo tanto, interrupción de la homeostasis (McGivern y Lemon, 2009).

La infección por HCV estimula el continuo crecimiento celular y la sobrerregulación de la expresión de la telomerasa, resultando en la inmortalización de las células. El HCV también sobrerregula a las metil transferasas y bloquea la expresión de los genes supresores tumorales, con lo que da origen al HCC (Thomas DL, 2000).

Virus linfotrópico humano tipo 1 (HTLV-1)

El genoma de este retrovirus, HTLV-1, es de cadena sencilla de ARN y se descubrió en adultos con leucemia de linfocitos T (Uchiyama, Yodoi, Sagawa, Takatsuki y Uchino, 1977). Es el único retrovirus conocido que se asocia directamente con neoplasias humanas. Existen en el mundo aproximadamente de 10 a 20 millones de pacientes infectados con HTLV-1 y su mecanismo preciso de patogénesis es un reto para los investigadores. La proteína Tax modula la expresión de varios genes virales y también altera las vías NF- κ B y Akt, promoviendo la supervivencia y proliferación celular, generando inestabilidad cromosómica y silenciamiento de p53.

Tax también regula su propia expresión, reclutando metil transferasas de histonas, modificando así la cromatina. HBz, otra proteína de HTLV-1, tiene también participación en el desarrollo del fenotipo oncogénico, Tax como iniciador y HBz como parte del mantenimiento (Matsuoka y Jeang, 2007).

Conclusión

El avance en el estudio de los virus y su función como un detonante oncogénico ha proporcionado el conocimiento del mecanismo de carcinogénesis, lo

cual resulta de vital importancia, ya que en promedio a nivel mundial 15.4% de los nuevos casos de cáncer se asocian a agentes infecciosos, entre ellos fundamentalmente al HPV, que está estrechamente relacionado al cáncer cervical, que en general es la cuarta causa de muerte en mujeres.

Los oncovirus pueden conducir al desarrollo del cáncer de distintas formas, aunque por sí mismos no son responsables del fenotipo oncogénico y es necesario considerar los factores inmunológicos y ambientales del hospedador, los cuales pueden integrar su genoma al genoma de la célula hospedadora, conduciendo así a la adquisición de infecciones crónicas y procesos inflamatorios; tienen la capacidad de producir mutaciones por inserción, delección y transposición en el genoma de la célula hospedadora, de activar la expresión de oncogenes, de interferir con los mecanismos de control de la proliferación celular, desactivando a los supresores tumorales como p53 y pRb al expresar oncoproteínas, o de inducir cambios en la regulación de protooncogenes y de los genes supresores tumorales.

Bibliografía

Aoki, Y., Jaffe, E. S., Chang, Y., Jones, K., Teruya-Feldstein, J., Moore, P. S. y Tosato, G. (1999). Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6. *Blood*, 93(12), 4034-4043.

Bagga, S. y Bouchard, M. J. (2014). Cell cycle regulation during viral infection. *Methods Mol Biol.*, 1170, 165-227.

Bailey, H. H., Chuang, L. T., DuPont, N. C., Eng, C., Foxhall, L. E., Merrill, J. K., Wollins, D. S. y Blanke, C. D. (2016). American society of clinical oncology statement: human papillomavirus vaccination for cancer prevention. *J. Clin. Oncol.*, 34(15), 1803-1812.

Bauer, J. H. y Helfand, S. L. (2006). New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. *Aging Cell.*, 5, 437-440.

- Boffetta, P. y Nyberg, F. (2003). Contribution of environmental factors to cancer risk. *Br Med Bull*, 68, 71-94.
- Bouchard, M. J. y Schneider, J. R. (2004). The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J. Virol.*, 78(23), 12725-12734.
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L. y Coglianò, V. (2009). A review of human carcinogens part B: biological agents. *Lancet Oncol.*, 10(4), 321-322.
- Colditz, G. A., Wolin, K. Y. y Gehlert, S. (2012). Applying what we know to accelerate cancer prevention. *Sci. Transl. Med.*, 4, 127rv4.
- Coussens, L. M. y Zena, W. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-867.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.*, 358, 502-511.
- Chami, M., Ferrari, D., Nicotera, P., Paterlini-Bréchet, P. y Rizzuto, R. (2003). Caspase-dependent alterations of Ca²⁺ signaling in the induction of apoptosis by hepatitis B virus X protein. *J Biol Chem.*, 278(34), 31745-31755.
- Cho, J. K. (2016). Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Specific Features of the Accompanying Immune Response. *Journal of Gastric Cancer*, 16(1), 1-7.
- De Groot, D. J., De Vries, E. G., Groen, H. J. y De Jong, S. (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 61, 52-60.
- De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D. y Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.*, 13(6), 607-615.
- Duensing, S. y Münger, K. (2002). Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene*, 21(40), 6241-6248.
- Elgui de Oliveira, D. (2007). DNA viruses in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 247, 182-196.
- Emmett, S. R., Dove, B., Mahoney, L., Wurm, T. y Hiscox, J. A. (2005). The cell cycle and virus infection. *Methods Mol Biol.*, 296, 197-218.
- Fraga, M. F. y Esteller, M. (2005). Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle*, 4, 1377-1381.
- Fuentes-González A. M., Contreras-Paredes, A., Manzo-Merino, J. y Lizano, M. (2013). The modulation of apoptosis by oncogenic viruses. *Viral J.*, 10, 182.
- Fujimuro, M., Wu, F. Y., ApRhys, C., Kajumbula, H., Young, D. B., Hayward, G. S. y Hayward S. D. (2003). A novel viral mechanism for dysregulation of b-catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *Nat Med.*, 9(3), 300-306.
- Ganem, D. (2006). KSHV infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 1, 273-296.
- Genitsch, V., Novotny, A., Seiler, C. A., Kröll, D., Walch, A. y Langer, R. (2015). Epstein-Barr virus in gastro-esophageal adenocarcinomas-single center experiences in the context of current literature. *Front Oncol*, 5, 73.
- Ghirelli, C. y Hagemann, T. (2013). Targeting immunosuppression for cancer therapy. *J Clin Invest.*, 123, 2355-2357.
- Gruhne, B., Sompallae, R., Marescotti, D., Kamranvar, S. A., Gastaldello, S. y Masucci, M. G. (2009). The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(7), 2313-2318.
- Guidotti, L. G. y Chisari, F. V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.*, 1, 23-61.
- Hofseth, L. J. y Ying, L. (2006). Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1765, 74-84.
- lizasa, H. N. (2012). Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. *Viruses*, 4(12), 3420-3439.

- International Agency for Research on Cancer. (2011). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A Review of Carcinogen Part B: Biological Agents*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Judson, H., et al. (1994). Basic genetic mechanisms. In *Molecular Biology of the Cell* (pp. 273-287). 3rd ed. New York: Garland Science.
- K Munger, H. P. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.*, 89, 213-228.
- Kajiya, Y., Hamasaki, K., Nakata, K., Miyazoe, S., Takeda, Y., Higashi, S., Ohkubo, K., Ichikawa, T., Nakao, K., Kato, Y. y Eguchi, K. (2001). A long-term follow-up analysis of serial core promoter and precore sequences in Japanese patients chronically infected by hepatitis B virus. *Dig Dis Sci*, 46(3), 509-515.
- Knudson, A. G. Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68, 820-823.
- Levine, A. J. (2009). The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology*, 384, 285-293.
- Litwin, T. R., Clarke, M. A., Dean, M. y Wentzensen, N. (2017). Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses*, 9(8), 206.
- Lok, A. S. (2004). Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127, S303-9.
- Lowy, D. R. y Schiller, J. (2012). Reducing HPV-associated cancer globally. *Cancer Prev. Res.*, 5, 18-23.
- Madkan, V., Cook-Norris, R. H., Steadman, M. C., Arora, A., Mendoza, N. y Tyring, S. K. (2007). The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. *Br J Dermatol*, 157(2), 228-241.
- Marigliò, G., Koch, S., Zhang, G., Weidner-Glunde, M., Rückert, J., Kati, S., Santag, S. y Schulz, T. F. (2017). Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV) Latency-Associated Nuclear Antigen (LANA) recruits components of the MRN (Mre11-Rad50-NBS1) repair complex to modulate an innate immune signaling pathway and viral latency. *PLoS Pathog.*, 13(4), e1006335.
- Matsuoka, M. y Jeang, K. T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer*, 7(4), 70-280.
- McGivern, D. R. y Lemon, S. (2009). Tumor suppressors, chromosomal instability and hepatitis C virus-associated liver cancer. *Annual review of pathology*, 4, 399-415.
- Munakata, T., Nakamura, M., Liang, Y., Li, K. y Lemon, S. M. (2005). Down-regulation of the retinoblastoma tumor suppressor by the hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(50), 18159-18164.
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 118, 3030-3044.
- Plummer, M., De Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F. y Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*, 4(9), e609-16.
- Poynard, T., Man-Fung, Y., Vlad, R. y Ching Lung, L. (2003). *Viral hepatitis C*. *Lancet*, 362, 2095-2100.
- Rowe, M., Peng-Pilon, M., Huen, D. S., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E. y Rickinson A. B. (1994). Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol*, 68(9), 5602-5612.
- Seeger, C. y Mason, W. S. (2000). Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 64(1), 51-68.
- Shackelford, J. y Pagano, J. S. (2004). Tumor viruses and cell signaling: Deubiquitination versus ubiquitination. *Mol Cell Biol.*, 24, 5089-5093.
- Stewart, B. W. (2008). Banding carcinogenic risks in developed countries: A procedural basis for qualitative assessment. *Mutat Res.*, 658, 124-151.

Sullivan, R., Dezube, B. J. y Koon, H. B. (2006). Signal transduction targets in Kaposi's sarcoma. *Curr Opin Oncol*, 18(5), 456-462.

Sxevik, M. (2012). Oncogenic viruses and mechanisms of oncogenesis. *Turk J Vet Anim Sci*, 36, 323-329.

Tamori, A., Yamanishi, Y., Kawashima, S., Kanehisa, M., Enomoto, M., Tanaka, H., Kubo, S., Shiomi, S. y Nishiguchi, S. (2005). Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. *Clin Cancer Res.*, 11(16), 5821-5826.

Thomas, D. L., Astemborski, J., Rai, R. M., Anania, F. A., Schaeffer, M., Galai, N., Nolt, K., Nelson, K. E., Strathdee, S. A., Johnson, L., Laeyendecker, O., Boitnott, J., Wilson, L. E. y Vlahov, D. (2000). The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA*, 284(4), 450-456.

Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K. y Uchino, H. (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*, 50(3), 481-492.

Verma, S. C., Borah, S. y Robertson, E. S. (2004). Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus up-regulates transcription of human telomerase reverse transcriptase promoter through interaction with transcription factor Sp1. *J Virol*, 78(19), 10348-10359.

Yan, L., Anderson, G. M., DeWitte, M. y Nakada, M. T. (2006). Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eur J Cancer*, 42(6), 793-802.

Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21, 497-503.

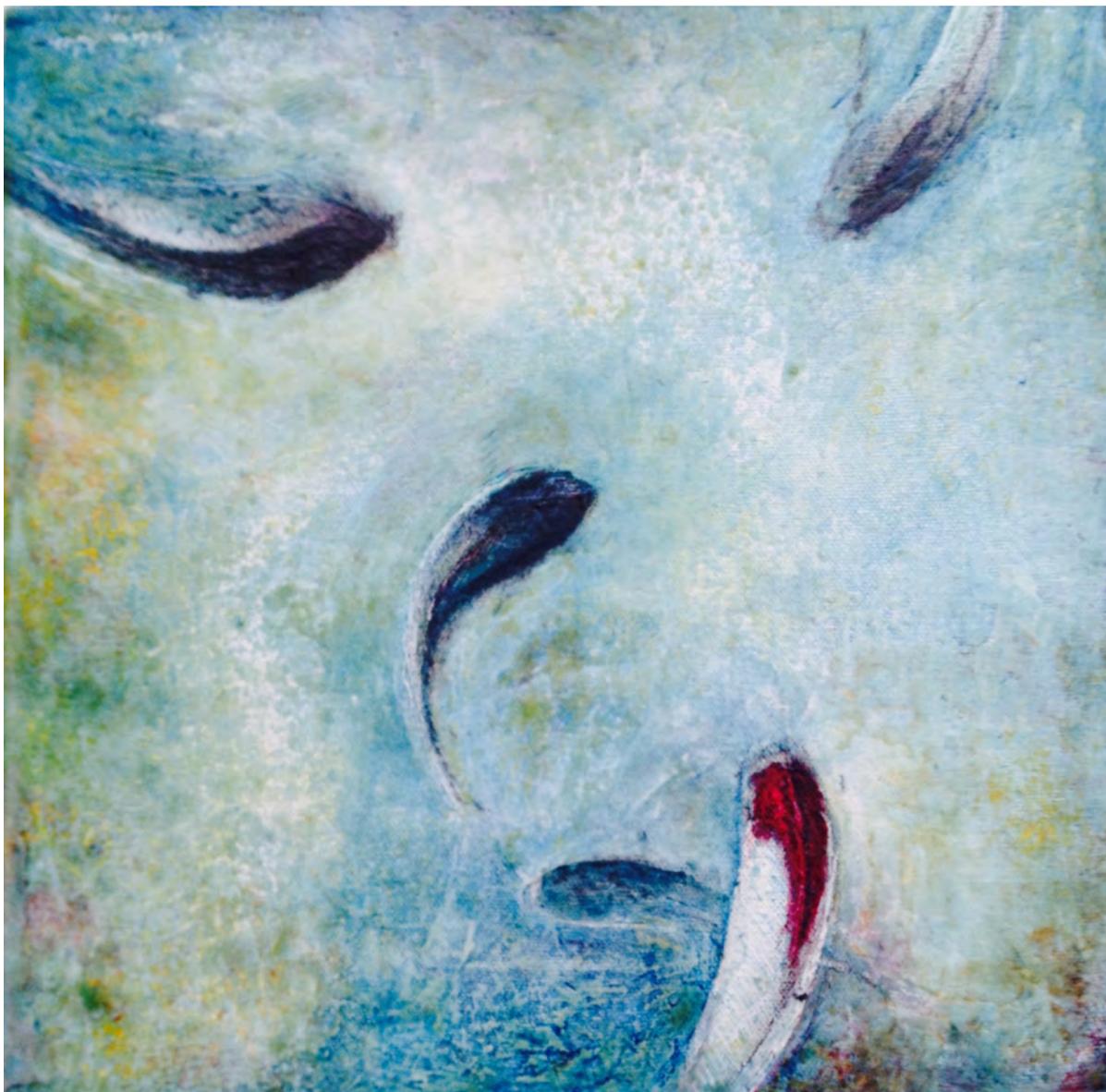
Young, L. S. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Rev. Cancer*, 4, 757-768.

Zheng, Z. (2010). Viral oncogenes, noncoding RNAs, and RNA splicing in human tumor viruses. *Int. J. Biol. Sci.*, 6, 730-755.

Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5, 263-74.



Detalle de "mayo primavera". Itzel Sánchez.



Melisa Sánchez Méndez.
"Serie de peces II",
medio encausto/tela,
40x40 cm,
2016.

CÁNCER HEPÁTICO, PROBLEMA DE SALUD SUBESTIMADO

LIVER CANCER, AN UNDERESTIMATED HEALTH PROBLEM

Adriana Ramírez-Cosmes¹ Gabriela Carrasco-Torres² José Fernando Sánchez-Pino¹
Irving Martínez-Contreras¹ Rafael Baltiérrez-Hoyos³ y Verónica Rocío Vásquez-Garzón^{*3}

Fecha de recepción: 28 de noviembre de 2016

Fecha de aceptación: 8 de noviembre de 2017

Resumen - El cáncer hepático es la segunda causa de muerte por cáncer más común a nivel mundial, el cuarto con mayor incidencia y el tercero más letal en México. Debido a los malos hábitos y la inadecuada alimentación de la población mexicana, ésta se encuentra en un riesgo elevado de desarrollar este tipo de enfermedad. En la actualidad, es difícil hacer un diagnóstico práctico y seguro del cáncer de hígado en etapas tardías y aún es más difícil en fases tempranas. Esta situación sumada a la escasa viabilidad y efectividad de los tratamientos, y a la carencia de registros fidedignos de incidencia nacional, anticipan una supervivencia muy baja. Es por eso que se requiere de una mayor atención y comprensión de dicho padecimiento, para la identificación de blancos terapéuticos y nuevos tratamientos oportunos. En este artículo revisamos los principales factores de riesgo del cáncer hepático, sus características biológicas, los actuales métodos de diagnóstico y las nuevas propuestas para su detección, permitiendo conocer el panorama contemporáneo y contribuir a investigaciones respecto de este problema de salud y reducir las altas tasas de incidencia y mortalidad.



Palabras clave:

Cáncer de hígado, factores de riesgo, biomarcadores, diagnóstico.

Abstract - Liver cancer is the second most common cancer death cause worldwide, the fourth with the highest incidence and the third most lethal in Mexico. Due to the bad habits and inadequate nutrition of the Mexican population, it is at a high risk of developing this type of disease. At present, it is difficult to make a practical and safe diagnosis of liver cancer in later stages and it is even more difficult in early stages. This situation, added to the scarce viability and effectiveness of the treatments, and the lack of reliable national incidence records, anticipate a very low survival rate. That is why it requires a greater attention and understanding of this condition, for the identification of therapeutic targets and new timely treatments. In this article we review the main risk factors for liver cancer, their biological characteristics, current diagnostic methods and new proposals for their detection, allowing us to know the contemporary panorama and contribute to research on this health problem and reduce the high rates of incidence and mortality.



Keywords:

Liver cancer, risk factors, biomarkers, diagnosis.

¹ Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. Correo electrónico: adrii.raco@hotmail.com

² Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

³ Conacyt, Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca.

* Responsable Técnico. Correo electrónico: vvasquezga@conacyt.mx

El cáncer hepático es la segunda causa de muerte por cáncer más común a nivel mundial, con 746 mil defunciones al año, el cuarto con mayor incidencia y el tercero más letal en México. Este tipo de cáncer es un problema que avanza de manera exponencial desde 1970 a la fecha. México carece de registros fidedignos de casos nacionales de cáncer y sólo cuenta con cifras relacionadas con mortalidad; el dato más aproximado existente en la bibliografía médica es el del Globocan, donde se reporta la mortalidad en incremento en 400% en personas menores a 65 años (Globocan, 2012). Se prevé que aumentará de los 12.7 millones de nuevos casos de cáncer en 2008 a 21.4 millones en 2030; los países como México tendrán 75% del acrecentamiento, siendo los cánceres de hígado relacionados con procesos infecciosos los de mayor recurrencia (Williams, 2014).

En un intento por identificar la incidencia en la población mexicana, en 1995 se creó el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas; sin embargo, ha quedado en un retraso importante en la recolección de datos. De acuerdo con la Secretaría de Salud, en el periodo 2000-2008 las enfermedades del hígado fueron la quinta causa de muerte a nivel nacional. Para Oaxaca, tumores malignos de hígado y de las vías biliares hepáticas ocuparon el tercer lugar y los padecimientos del hígado, incluyendo afecciones alcohólicas del hígado, ocuparon el quinto lugar (Secretaría de Salud, 2014).

Factores de riesgo

Existen diversos factores de riesgo que predisponen para el cáncer hepático. No obstante, éstos no lo indican todo, presentar uno o incluso varios no significa que se desarrollará la enfermedad (Kumar, Abbas y Aster, 2016).

Según Gomaa, Khan, Toledano, Waked y Taylor-Robinson (2008), los principales factores de riesgo son:

- Infección causada por virus de hepatitis B y C
- Cirrosis por cualquier causa (principalmente alcoholismo)

- Malos hábitos alimenticios que pueden desencadenar hígado graso, el cual conlleva inflamación y cicatrización del hígado
- Consumo de aflatoxinas (toxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*)
- Síndrome metabólico y enfermedades crónico-degenerativas de tipo vascular, como diabetes e hipertensión.

Los factores de menor peligro son:

- Cirrosis primaria de vías biliares
- Enfermedades por depósito de glucógeno
- Citrulinemia
- Porfiria cutánea tardía
- Tirosinemia hereditaria
- Enfermedad de Wilson
- Hemocromatosis hereditaria (Gomaa *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que una dieta equilibrada, rica en frutas y verduras, reduce el índice de cáncer (Liu, 2015). Sin embargo, un problema de gran importancia, que no se ha logrado contrarrestar y ha sido subestimado, es que la dieta de la población mexicana se caracteriza por ser alta en grasas trans, generadoras de radicales libres. Así también, en México el índice de pacientes con sobrepeso, diabetes mellitus y con enfermedades hepáticas crónicas es elevado; esto, junto con otros factores de riesgo existentes para desarrollar cáncer de hígado como el consumo excesivo de alcohol, hacen del diagnóstico oportuno una urgente prioridad de política pública, además de implementar las medidas necesarias para su prevención (Barquera, Campos-Nonato, Hernández-Barrera, Pedroza, Rivera-Dommarco, 2012), ya que actualmente cuando se diagnostica cáncer de hígado las posibilidades de tratamiento son escasas y poco efectivas.

En México sigue siendo una barrera importante el acceso a la información sobre este padecimiento, así como los procedimientos para su detección oportuna. Existen, además, diferencias importantes entre la cantidad y la calidad de la información disponible,

aquella con la que cuenta la gente, y la manera en que la convierten en conocimiento y toman acciones en favor de su salud.

Si bien en este país, según datos de la Secretaría de Salud, hay más de 70 organizaciones de la sociedad civil (OSC) de lucha contra el cáncer, muchas de ellas operan bajo un enfoque meramente asistencial e informativo. Se requiere que un mayor número mejoren como sociedad civil organizada, de manera que impacten contundentemente la atención integral que se brinda a las personas con diagnóstico de cáncer de hígado.

Manifestaciones clínicas

Los síntomas son inespecíficos y se evidencian hasta que el paciente registra un deterioro importante de su salud, cuando presenta caquexia, debilidad y malestar general. La ascitis puede ser sanguinolenta, con posibilidad de que haya una trombosis portal, donde el cáncer ya es muy avanzado (Cornett y Dea, 2015; Plancarte, Guillén, Guajardo y Mayer, 2004). Existen otras manifestaciones, como fiebre de origen desconocido, ictericia asociada al cáncer hepático tales como una elevación de la fosfatasa alcalina y la GGT-Gammaglutamil transpeptidasa, sin incremento significativo de la bilirrubina, que constituyen lo que se conoce como patrón de colestasis disociada y se observa en la obstrucción intermitente de la vía biliar, granulomatosis hepática (Dufour, Lott, Nolte, Gretch, Koff y Seeff, 2000; Gopal y Rosen, 2000), hepatomegalia más dolor abdominal agudo e hipertransaminasemias en pacientes asintomáticos, pudiendo presentarse también una elevación del hemidiafragma derecho (Debs, Kassir, Amor, Martini, Iannelli y Gugenheim, 2014).

Morfológicamente, se origina un cambio de tamaño que sucede en el espacio portal de las células hepáticas con un núcleo amorfo (figura 1). Los hepatocitos tienen un incremento ligero de hiperromatismo y/o pleomorfismo celular; además, las células que muestran cambio de tamaño suelen

formar pequeños nódulos expansivos dentro de un solo lobulillo parenquimatoso. Los nódulos pueden ser con displasia de bajo y de alto grado (Sun y Song, 2015; Assy, Nasser, Djibre, Beniashvili, Elias y Zidan, 2009).

Macroscópicamente se puede visualizar:

- Una masa unifocal (habitualmente grande)
- Nódulos multifocales distribuidos de forma amplia y de tamaño variable
- Un cáncer infiltrante difuso
- Cambio de color del hígado (rojo pardo), dependiendo de la alteración a la que se asocie, de color blanquecino si es cirrótico o amarillento si es un hígado graso.

Diagnóstico

El diagnóstico se realiza mediante técnicas de imagenología y serológicas; sin embargo, la utilización de marcadores como prueba de diagnóstico, entre ellas alfa-fetoproteína, ha tenido deficiencias debido a que también se presenta en pacientes con hepatitis y cirrosis (Song, Xia, Inagaki, Hasegawa, Sakamoto, Kokudo y Tang, 2016).

Las pruebas suelen realizarse en enfermos considerados de alto riesgo:

1. Pacientes con cirrosis de cualquier causa
2. Pacientes infectados con el virus de hepatitis B en cualquier etapa
3. Pacientes infectados con el virus de hepatitis C en fase cirrótica o con carga viral elevada.
4. Hepatopatías crónicas de cualquier etiología previamente estables con descompensación súbita inexplicable (Kumar *et al.*, 2016).

Una vez detectada alguna lesión sospechosa se debe dar seguimiento cada seis a 12 meses, por medio de una tomografía axial computarizada contrastada de cuatro fases (simple, arterial, venosa y portal). Los tratamientos abarcan desde resección, trasplante hepático, inyección de alcohol, ablación por radiofrecuencia hasta quimioembolización (SMeO, 2012).

Biología celular asociada al cáncer hepático

Se han identificado las características principales que adquieren las células cancerosas, como evasión de la apoptosis, señalización sostenida para crecimiento, insensibilidad a señales de anticrecimiento, potencial replicativo ilimitado, sostenida angiogénesis, así como invasión de tejido y metástasis; además de alteraciones genéticas asociadas a funciones toxicológicas, biológicas y canónicas. Las principales vías de señalización desreguladas son la del factor de crecimiento transformante/receptor del factor de crecimiento transformante (TGF-beta/TBR), factor de crecimiento parecido a insulina/receptor del IGF-1 (IGF/IGF-R1) (figura 2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF/MET), Wnt/beta-catenina/FZD y el factor de crecimiento transformante/receptor del factor de crecimiento epidermal (TGF-alfa/EGFR) (Hanahan y Weinberg, 2000).

Los nuevos tratamientos contra el cáncer de hígado, como AG1024 y Gefitinib, bloquean a nivel del receptor para IGF-R1 (Yao, Liu, Sheng y Huang, 2011); algunas otras drogas son Rapamycin, CCI-779 y RAD001, que se encuentra en investigación (Zaytseva, Valentino, Gulhati y Evers, 2012). En estudios clínicos de fase II, Sorafenib demostró reducir la proliferación celular y la angiogénesis del tumor, además, ocasionó una reducción del tumor en 43% de los casos (Kitisin, Pishvaian, Johnson y Mishra, 2007).

Biomarcadores en cáncer hepático

Uno de los grandes desafíos para la medicina y la ciencia es la detección del cáncer hepático en etapas tempranas, para un tratamiento oportuno; empero, debido a la heterogeneidad tumoral y la diversidad de los factores de riesgo, los tratamientos resultan ineficaces, por ello es necesario profundizar en el conocimiento de todos los factores que participan en la iniciación, desarrollo y progresión del cáncer. Esto ha llevado a los investigadores a indagar y aplicar distintas tecnologías de nueva generación en busca

de biomarcadores tempranos útiles para localizar y desarrollar tratamientos no invasivos del cáncer hepático y mejorar la calidad de vida de los pacientes. En la última década, en la práctica clínica se busca emplear herramientas como biomarcadores séricos y pruebas de imagen que no resulten incómodos o riesgosos para el diagnóstico precoz y vigilancia del cáncer hepático (Singal, Volk, Waljee, Salgia, Higgins, Rogers y Marrero, 2009).

Existen métodos de diagnóstico como los marcadores de antígenos tumorales, entre ellos el carbohidrato-125, carbohidrato 19-9 y antígeno carcino-embriionario combinado con antígeno histopatológico, pero estos métodos aún continúan siendo un tanto inespecíficos. Además, diferentes países siguen analizando biomarcadores séricos como alfa fetoproteína (AFP) para el seguimiento de cáncer hepático; así como éste, están AFP-L3, des-carboxyprothrombina (DCP), Dickkopf-1 (DKK1) y midkine (MDK), (Song *et al.*, 2016), así también se reportan micro-ARN's que están siendo considerados como biomarcadores, tales como miR-25, miR-375 y let-7f, los cuales podrían proporcionar una sensibilidad de 97,9% y una especificidad de 99,1% en el diagnóstico de cáncer hepatocelular (Li, Hu, Zhou, Chen, Liu, Zhang, Shen, Zhang y Zen, 2010).

Se ha demostrado la sobreexpresión a nivel génico y proteico de Ezri (EZR) y Podocalyxin (PODXL), ambas proteínas asociadas a un mal pronóstico de varios tipos de cáncer debido a su participación en la invasión y migración tumoral, sugiriéndolas como posibles marcadores para predecir el cáncer hepatocelular (Flores, López, Vásquez-Garzón, y Villa-Treviño, 2015). Asimismo, han surgido nuevas aportaciones como la aplicación de múltiples terapias mediante la inhibición de cinasas, como el Sorafenib; sin embargo, dichas terapias parecen ser limitadas, pues sólo incrementan la esperanza de vida de los pacientes de ocho a 11 meses (Llovet, Ricci, Mazzaferro, Hilgard, *et al.*, 2008). Aún se realiza una ecografía abdominal, pero tiene escasa sensibilidad y especificidad que han limitado el diagnóstico (Singal *et al.*, 2009).

Por lo anterior, con el actual avance tecnológico se ha comenzado a utilizar herramientas como la proteómica y la genómica, con las que se pretende estudiar y encontrar cambios funcionales en el proteoma humano originados por patologías o padecimientos como el cáncer, para así comprender y caracterizar los mecanismos moleculares relacionados con la tumorigénesis y después validar biomarcadores proteicos asociados a tal enfermedad (Alfaro, Sinha, Kislinger y Boutros, 2014).

Se han analizado perfiles de expresión de proteínas en algunos tipos de cáncer, como el hepatocelular, con la finalidad de encontrar péptidos específicos de tumor; sin embargo, esto se ha vuelto un desafío, en virtud de la complejidad del genoma y transcriptoma, así como de los mecanismos de regulación de la expresión, mutaciones y otras aberraciones que han dificultado dicho propósito (Alfaro *et al.*, 2014). Ejemplo de lo anterior es que se identificaron mediante proteómica cuantitativa biomarcadores urinarios potenciales para este tipo de cáncer, los cuales fueron detectados en pacientes y comparados con personas sanas, proponiendo realizar investigaciones posteriores que reafirmen lo antes dicho y puedan ser propuestos como marcadores para el diagnóstico oportuno (Shyh y King, 2016).

Siguiendo el empleo de técnicas moleculares, en los últimos años diversas investigaciones se han centrado en estudiar los micro ARN's y su participación en el cáncer. Estos son pequeñas secuencias de nucleótidos (19-20 nucleótidos) cuya función es regular la expresión genética al disminuir o bloquear la síntesis de proteínas (Maitri, Ferrajoli, Sood, López-Berestein y Calin, 2016), participando además en una gran variedad de procesos biológicos, como diferenciación celular, proliferación y apoptosis, siendo más de un tercio de genes en humanos objetivo de dichas secuencias (Tomimaru, Eguchi, Nagano, Wada, Kobayashi, Marubashi *et al.*, 2012) (figura 3). La desregulación de los micro-ARN's se ha relacionado con el desarrollo de algunas enfermedades (Wang, Ding, Li, Liu, Wu, Wu y Yu, 2016).

Hasta la fecha se han propuesto algunos micro-ARN's circulantes como posibles marcadores tumorales en distintos tipos de cáncer, como el de hígado, de pulmón, de mama y de tiroides; también se ha demostrado que distintos microARN's intervienen en diversas funciones y participan en el desarrollo de la tumorigénesis, asociando a muchos de éstos al microambiente tumoral, procesos intercelulares y respuesta inmune (miR-17-92, miR-222, miR-339) (Maitri *et al.*, 2016).

De lo anterior se cuenta con varias evidencias, en las que han evaluado la presencia de distintos micro ARN's que podrían estar implicados en el desarrollo de cáncer hepático. Se ha propuesto la combinación de miR-15b y miR-130 como un marcador útil para el diagnóstico de dicho cáncer (Liu, Yao, Wang, Wong, Lee, Fan, Poon, Gao y Luk, 2012). Asimismo, mediante qRT-PCR demostraron que los niveles de micro-ARN-21 en plasma disminuyeron en pacientes con cáncer hepático después de realizase cirugía de resección. Sus estudios indican que los niveles de dicho micro-ARN en plasma fueron mayores en 126 pacientes con cáncer hepático que en aquellos con hepatitis crónica y voluntarios sanos (Tomimaru *et al.*, 2012).

A través de un microarreglo de expresión se encontró una expresión anormal de 92 micro-ARN's en tejidos tumorales en comparación con tejidos no tumorales adyacentes. De éstos, se observó una disminución de la expresión de miR-15b-5p, miR-338-5p y miR-764 en el plasma postoperatorio, correlacionándose positivamente este último con el tamaño del tumor. Así, se propusieron estos tres micro-ARN's como posibles biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de hígado (Chen, Chen, Liu, Li y Huang, 2015).

La expresión de diversos micro-ARN's no sólo está relacionada con una función oncogénica, pues hay algunas evidencias que catalogan a algunos como supresores de tumor; un ejemplo es el MiR-139-5p, reportado con disminución en su expresión en cáncer hepatocelular, esta baja expresión en tejidos cancerosos se ha vinculado con un mal pronóstico (Wang *et al.*, 2016).

A partir de tales evidencias y conociendo la capacidad de regulación de los micro-ARN's y otras pequeñas secuencias de ARN se han propuesto terapias dirigidas al silenciamiento de genes claves, o al silenciamiento de los propios micro-ARN's para mejorar la detección oportuna, evitar y reducir las posibilidades del desarrollo de cáncer de hígado (Sun, Zhang, Feng, Liu, Xie, Qin, Zhao y Wan, 2017; Yang, Zhao, Hou, Li, Wang, Wu, Sun, Han, Sun, Song, Huang y Shao, 2017; Li *et al.*, 2015; Yang, Li, Chang, Wang, Song, Gao, Hu, Li, Liu, Yao y Huang, 2014).

Conclusión

En México, el cáncer de hígado ocupa uno de los primeros lugares de incidencia, además de ser una de las principales causas de muerte. Se plantea reafirmar el compromiso de contribuir al proceso de toma de decisiones, de formular e implementar proyectos, de fortalecer las instituciones y de ampliar la investigación sobre el cáncer de hígado como una prioridad en el tema de salud de mujeres, hombres y para los sistemas en la materia.

Hoy en día no existen biomarcadores de diagnósticos prácticos y confiables en etapas tardías y menos aún en tempranas, además de la escasa viabilidad y efectividad de los tratamientos, lo que repercute en una mayor tasa de mortalidad. Por lo tanto, la detección oportuna desempeña un papel crucial para un mayor éxito del tratamiento, o mejor todavía, la prevención del cáncer hepático solucionaría una de las causas de muerte más importantes por cáncer. De ahí que el estudio de las fases tempranas de la carcinogénesis ha tenido gran importancia para entender mejor el origen y progresión de dicha enfermedad, así como para encontrar métodos de diagnóstico efectivos. El estudio de la biología celular del cáncer nos dará un mejor panorama para comprender los procesos biológicos alterados durante esta enfermedad, así como ofrecer a la población mayor información y bases para la búsqueda de un método de diagnóstico efectivo y viable, así como posibles blancos terapéuticos.

Figura 1.

Tinción de Hematoxilina y Eosina. Biopsia de carcinoma hepatocelular. Se puede apreciar un carcinoma *in situ*, así como infiltrados inflamatorios, además de células binucleadas y núcleos amorfos a causa de la patología. A) 4X y B) 8X.

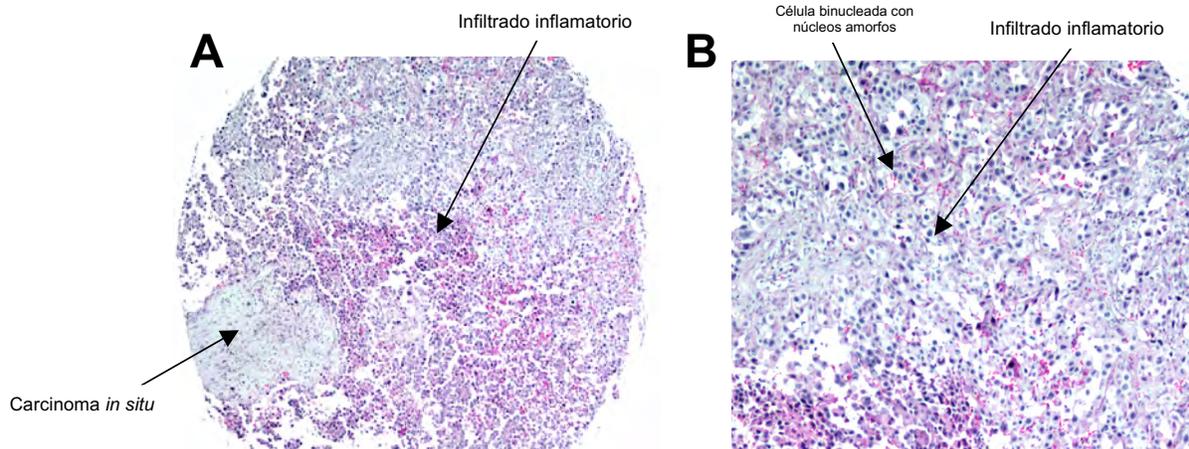


Figura 2.

Vía de señalización asociada a IGF. IGF-I e IGF-II se unen a su receptor (IGFR), un receptor tirosina quinasa (RTK) con alta afinidad que fosforila a las proteínas intracelulares, incluyendo a sustratos receptores de insulina (IRS), como PI3K, AKT/PKB y MAPK, las cuales participan en la inhibición de la muerte celular programada y activan la proliferación y crecimiento celular. AG1024 y Gefitinib bloquean a nivel del receptor para IGF (IGF-R1), Rapamicyn, CCI-779 y RAD001 disminuyen la proliferación celular.

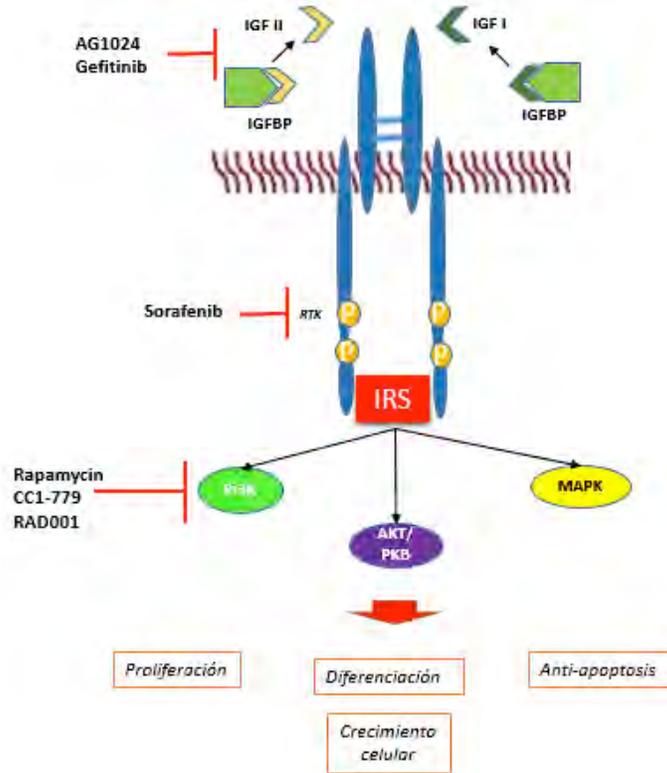
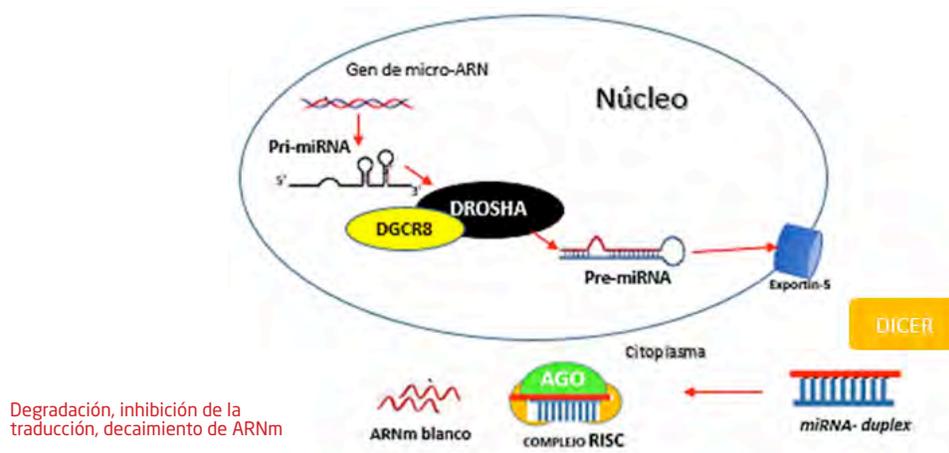


Figura 3.

Biogénesis de micro-ARN's. Se muestra la síntesis, procesamiento y maduración de micro-ARN's.



Bibliografía

- Alfaro, J. A., Sinha, A., Kislinger, T. y Boutros, P. C. (2014). Onco-proteogenomics: cancer proteomics joins forces with genomics. *Nat Methods*, *11*, 1107e13.
- Assy, N., Nasser, G., Djibre, A., Beniashvili, Z., Elias, S. y Zidan, J. (2009). Características de las lesiones hepáticas sólidas comunes y recomendaciones para el diagnóstico. *World J Gastroenterol.*, *15*(26), 3217-3227.
- Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza, A. y Rivera-Dommarco, J. A. (2012). Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos. *ENSANUT*, *55*(suppl), S151-S160.
- Chen, Y. Chen, J., Liu, Y., Li, S. y Huang, P. (2015). Plasma miR-15b-5p, miR-338-5p and miR-764 as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Med Sci Monit.*, *21*, 1864-1871.
- Cornett, P. A. y Dea, T. O. (2015). *Diagnóstico clínico y tratamiento*. 54 ed. Mcgraw-Hill/Interamericana editores, S.A. de C.V.
- Debs, T., Kassir, R., Amor, I. B., Martini, F., Iannelli, A. y Gugenheim, J. (2014). Solitary fibrous tumor of the liver: report of two cases and review of the literature. *Nt J Surg*, *12*(12), 1291-1294.
- Dufour, D. R., Lott, J. A., Nolte, F. S., Gretch, D. R., Koff, R. S. y Seeff, L. B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Lin Chem*, *46*(12), 2027-2049.
- Flores-Téllez, T. N. J., López, T. V., Vásquez-Garzón, V. R. y Villa-Treviño, S. (2015). Co-Expression of Ezrin-CLIC5-Podocalyxin is associated with migration and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, *10*(7), e0131605.
- Globocan. (2012). (IARC) *Section of Cancer Surveillance*.
- Gomaa, A. I., Khan, S. A., Toledano, M. B., Waked, I. y Taylor-Robinson, S. D. (2008). Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*, *14*(27), 4300-4308.
- Gopal, D. V. y Rosen, H. R. (2000). Abnormal findings on liver function tests. *Postgrad Med.*, *107*(2), 100-114.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.*, *100*(1), 57-70.
- Kitisin, K1, Pishvaian, M. J., Johnson, L. B. y Mishra, L. (2007). Liver stem cells and molecular signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Gastrointest Cancer Res.*, *1*(4 Suppl 2), S13-21.
- Kumar, V., Abbas, A. y Aster, J. (2016). *Patología estructural y funcional*. 9 ed. Barcelona: Elsevier.
- Li, L. M., Hu, Z. B., Zhou, Z. X., Chen, X., Liu, F. Y., Zhang, J. F., Shen, H. B., Zhang, C. Y. y Zen, K. (2010). Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res.*, *70*, 9798-9807.
- Li, S., Li, J., Fei, B. Y., Shao, D., Pan, Y., Mo, Z. H., Sun, B. Z, Zhang, D., Zheng, X., Zhang M., Zhang, X. W. y Chen, L. (2015). MiR-27a promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation through suppression of its target gene peroxisome proliferator-activated receptor . *Chin Med J.*, *128*(7), 941-947.
- Liu, A. M., Yao, T. J., Wang, W., Wong, K. F., Lee, N. P., Fan, S. T., Poon, R. T., Gao, C. y Luk, J. M. (2012). Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *BMJ Open*, *2*(2), e000825.

- Liu, H. (2015). Fruit and vegetable consumption and risk of bladder cancer: an updated meta-analysis of observational studies. *Eur J Cancer Prev*, 24, 508-516.
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., De Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J. F., Borbath, I., Häussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D. y Bruix, J. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359, 378e90.
- Maitri, Y., Ferrajoli, A., Sood, A. K., López-Berestein, G. y Calin, G. (2016). MicroRNA Therapeutics in Cancer-an Emerging Concept. *EBioMedicine*, 12, 34-42.
- Plancarte, R., Guillén, M. R., Guajardo, J. y Mayer, F. (2004). Ascites in cancer patients. Physiopathology and therapeutic options. *Rev Soc Esp Dolor*, 11, 156-162.
- Secretaría de Salud. 2014. Mortalidad. Dirección general de información en salud. México, D.F.
- Shyh-Horng, C. y King-Teh, L. (2016). Proteomic analysis and translational perspective of hepatocellular carcinoma: Identification of diagnostic protein biomarkers by an onco-proteogenomics approach. *Elsevier*, 32(11), 535-544.
- Singal, A., Volk, M. L., Waljee, A., Salgia, R., Higgins, P., Rogers, M. A. y Marrero, J. A. (2009). Meta-analysis: surveillance with ultrasound for earlystage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 30, 37-47.
- SMeO. (2012). Guía mexicana de tratamiento del hepatocarcinoma avanzado. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 11, Supl. 2.
- Song, P. P., Xia, J. F., Inagaki, Y., Hasegawa, K., Sakamoto, Y., Kokudo, N. y Tang, W. (2016). Controversies regarding and perspectives on clinical utility of biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 22, 262-274.
- Sun, G., Zhang, C., Feng, M., Liu, W., Xie, H., Qin, Q., Zhao, E. y Wan, L. (2017). Methylation analysis of p16, SLIT2, SCARA5, and Runx3 genes in hepatocellular carcinoma. *Medicine*, 96(41), e8279.
- Sun, H. y Song, T. (2015). Hepatocellular carcinoma: advances in diagnostic imaging. *Drug Discov Ther*, 9, 310-318.
- Tomimaru, Y., Eguchi, H., Nagano, H., Wada, H., Kobayashi, S., Marubashi, S., et al. (2012). Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 56, 167-175.
- Wang, Z., Ding, Q., Li, Y., Liu, Q., Wu, W., Wu, L. y Yu, H. (2016). Reanalysis of microRNA expression profiles identifies novel biomarkers for hepatocellular carcinoma prognosis. *Tumour Biol*, 37(11), 1-9.
- Williams, R. (2014). Addressing liver disease in the UK: a blueprint for attaining excellence in health care and reducing premature mortality from lifestyle issues of excess consumption of alcohol, obesity and viral hepatitis. *Lancet*, 384(9958), 1953-1997.
- Yao, W. F., Liu, J. W., Sheng, G. L. y Huang, D. S. (2011). Blockade of IGF-IR exerts anticancer effects in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep*, 4(4), 719-722.
- Yang, Y., Li, M., Chang, S., Wang, L., Song, T., Gao, L., Hu, L., Li, Z., Liu, L., Yao, J. y Huang, C. (2014). MicroRNA-195 acts as a tumor suppressor by directly targeting Wnt3a in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep*, 10(5), 2643-2648.
- Yang, Y., Zhao, Z., Hou, N., Li, Y., Wang, X., Wu, F., Sun, R., Han, J., Sun, H., Song, T., Huang, C. y Shao, Y. (2017). MicroRNA 214 targets Wnt3a to suppress liver cancer cell proliferation. *Mol Med Rep*, 16(5), 6920-6927.
- Zaytseva, Y. Y., Valentino, J. D., Gulhati, P. y Evers, B. M. (2012). MTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett*, 319, 1-7.



Melisa Sánchez Méndez.
"Serie de peces II",
encausto/tela,
40x40 cm,
2016.

FIBROGÉNESIS HEPÁTICA: CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS

HEPATIC FIBROGENESIS: LIVER STELLAR CELLS

Osiris G. Idelfonso García¹ Alma A. Ramírez Hernández¹
Jovito C. Santos Álvarez² Juan M. Velázquez Enríquez²
Gabriela Carrasco Torres³ Verónica R. Vásquez Garzón⁴
y Rafael Baltiérrez Hoyos⁵

Fecha de recepción: 30 de noviembre de 2016

Fecha de aceptación: 17 de octubre de 2017

Resumen - La fibrosis hepática afecta tanto la cantidad como la composición de la matriz extracelular. Este proceso puede acompañar a cualquier enfermedad crónica del hígado, que se caracteriza por una patología hepatobiliar o inflamación. Ahora existe considerable evidencia para reconocer a las células estelares hepáticas como las principales productoras de matriz en la fibrogénesis; por tal motivo, el objetivo en la investigación es proporcionar una visión general sobre las células estelares en el proceso fibrogénico.

Abstract - Liver fibrosis affects both the amount and the composition of the extracellular matrix. This process may occur during chronic liver disease characterized by hepatobiliary disease or inflammation. There is now considerable evidence to support the role of the hepatic stellate cells (HSC) as the main matrix producing cells in fibrogenesis. The focus on this review is to provide insight into hepatic stellate cells in the fibrogenic process.



Palabras clave:

Fibrosis, células estelares, matriz extracelular.



Keywords:

Fibrosis, stellate cells, extracellular matrix.

¹ Biomedicina Experimental, Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca.

² Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca.

³ Departamento de Nanociencias y Nanotecnología, CINVESTAV.

⁴ Conacyt, Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca.

⁵ Conacyt, Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. Responsable técnico.

Introducción

El hígado es considerado el segundo órgano más importante para el ser humano, después del cerebro. Su relevancia radica en que lleva a cabo funciones vitales de biotransformación, tales como la síntesis de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, ácidos biliares, colesterol, lípidos, algunas vitaminas de reserva y la desintoxicación contra xenobióticos (Malarkey, Johnson, Ryan, Boorman y Maronpot, 2005).

Este órgano presenta una estructura morfológica y fisiológica muy heterogénea, en la que el lóbulo hepático está formado por células parenquimatosas (hepatocitos), las cuales constituyen 80% del volumen total del hígado y realizan la mayoría de las funciones. Por otro lado, las células no parenquimatosas hepáticas contribuyen sólo con 6.5% del volumen total; el 13.5% restante está conformado por otros tipos celulares, entre los que encontramos células dendríticas y células de Kupffer. Estructuralmente, puede decirse que 40% de todos los tipos celulares se localizan en el compartimiento sinusoidal, en el cual ubicamos a las células estelares hepáticas que se reconocen como las principales mediadoras de la enfermedad crónica progresiva (Hernández, 2004; Weiskirchen y Tacke, 2014).

Células estelares hepáticas

Las células estelares hepáticas (CEH) se han descrito anteriormente como células de Ito, lipocitos o células perisinusoidales; son de origen mesenquimal y se localizan en el espacio de Disse, en el órgano sano se encuentra en estado quiescente (Friedman, 2004). Su principal función es remodelar la matriz extracelular (MEC), además de mantener la homeostasis de los retinoides en el citoplasma, reteniendo 80% del total de retinoides en el cuerpo (Senoo, 2004). Todas estas peculiaridades se han relacionado de manera importante con el desarrollo de la fibrosis hepática (Friedman, 2008).

Las CEH se encuentran en estado quiescente, no obstante, son capaces de activarse en respuesta a diferentes estímulos agresores o xenobióticos,

proceso durante el cual las células se desdiferencian, presentando cambios en su fenotipo (De Oliveira, Ramos y Morales, 2017). La diferenciación se asemeja a los miofibroblastos, cuando éstos presentan una mayor contractilidad e incrementan la síntesis de proteínas de MEC hasta ocho veces con respecto a un hígado sano. Es por ello que se han considerado como las principales productoras de colágena tipo I y III, así como de fibronectina y de proteoglicanos, modificando las propiedades de la MEC, lo cual favorece la inducción de la fibrosis (Wells, 2008).

Por otro lado, además de modificar las propiedades de la MEC, las células estelares activadas son capaces de proliferar. Se sabe que las CEH responden a factores de crecimiento, como el de crecimiento transformante beta (FCT- β) y el de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP) (Borkham, Roeyen y Ostendorf, 2007).

En el proceso de activación de las CEH se han reportado dos fases: la primera es la iniciación, en la cual ocurren los cambios en la expresión génica y de fenotipo; y la segunda es la perpetuación, en la que las células presentan la mayor parte de las transformaciones, como proliferación, quimiotaxis, fibrogénesis, contractibilidad, así como la pérdida de retinoides (Hernández y Friedman, 2011).

Según el agente agresor y el tiempo al cual el hígado se encuentre expuesto, será la magnitud de la respuesta de las células estelares. En el caso de un daño agudo, dichas células se activan, proliferan y tienden a migrar; se induce la producción de proteínas de MEC y se lleva a cabo la fibrólisis. Esta activación es dependiente de algunas proteinasas, lo que da como resultado la reparación de la afectación en el tejido. En este caso, se piensa que cuando las células estelares activadas terminan su función, mueren por apoptosis (De Minicis Candelaresi, Agostinelli, Taffetani, Saccomanno, Rychlicki, Trozzi, Marzioni, Benedetti y Svegliati-Baroni, 2012). Sin embargo, esto no ocurre cuando el daño es crónico, es decir, cuando el agente agresor se mantiene o las agresiones son constantes. En esta circunstancia, las células estelares también se

activan, proliferan y migran, pero nunca se presenta la señal para que mueran por apoptosis; aparentemente continúan con una autoestimulación en la activación y en la producción de matriz extracelular. Además, se sabe que ésta puede modular la activación y proliferación de las células estelares, la angiogénesis y la actividad de los factores de crecimiento, e inducir señales para que se polaricen, adhieran, migren, se desarrollen y diferencien (Adachi, Osawa, Uchinami, Kitamura y Accili, 2007), por lo que en presencia de un estímulo crónico, el daño se perpetúa, dando como resultado una fibrosis hepática. Esta lesión es una respuesta de tipo herida-cicatrización exacerbada, caracterizada por la acumulación de matriz extracelular (Hernández y Friedman, 2011).

Regeneración y reparación hepática

Es importante considerar que después de un daño hepático, el tejido lesionado debe ser reemplazado por tejido nuevo que cumpla con la misma función, proceso al que se conoce como regeneración. En el hígado humano esta capacidad es limitada, ya que los hepatocitos se encuentran en estado quiescente y en condiciones normales no se duplican, sólo lo hacen después de sufrir un deterioro (Fausto, Campbell y Riehle, 2006).

La capacidad de las células para empezar a multiplicarse y regenerar el tejido responde principalmente a dos factores relacionados con la muerte celular circundante:

a) La señal dada por el aumento del RNA mensajero del factor de necrosis tumoral α (TNF α , tumor necrosis factor α) y de la interleucina 6 (IL-6).

b) La señal que se genera en respuesta a la liberación de citocinas como IL-6, factores de transcripción como NF-kB, STAT3 de las células vecinas, que tratarán de fomentar la proliferación para poder reemplazar a las células muertas.

En el hígado, tal respuesta está determinada y coordinada por las células de Kupffer y las CEH, ya

que se propone que secretan citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento como reacción al daño en el tejido (Fujiyoshi y Ozaki, 2011). Algunos de los factores más importantes que se han estudiado en relación con los eventos antes mencionados son el crecimiento de hepatocitos (HGF), el de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el de crecimiento epidermal (EGF), los cuales activan varias vías de señalización relacionadas con los procesos de proliferación de los hepatocitos en respuesta a un daño. Una de las principales vías que se accionan son las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), en donde se involucran varias cinasas como MAPK, la proteína cinasa reguladora de señales extracelulares (ERK), MERK1/2, ERK1/2, que activan la remodelación del citoesqueleto, la proliferación y la diferenciación celular (Brow y Sacks, 2008).

Otra vía de señalización relacionada con la regeneración de los hepatocitos es la de JAK (Janus Kinase), el transductor de señal y activador de la transcripción (STAT), que están vinculadas a la respuesta inflamatoria, de proliferación y supervivencia después de una afectación hepática (Schindler y Plumleec, 2008).

Por otro lado, la regeneración hepática también implica a la vía de señalización de AKT/PI3K, esta última es una cinasa lipídica intracelular que fosforila a la proteína AKT, que es una cinasa de serina-treonina. Dicha cascada de señalización regula el metabolismo celular, la supervivencia, la mitogénesis, la motilidad, polaridad y el tráfico de vesículas (Krasilnicov, 2000). En resumen, se puede decir que el daño hepático estimula la activación de las células de Kupffer y de las células estelares hepáticas que secretan citocinas y factores de crecimiento como HGF y PDGF, entre otros.

Fibrosis hepática

La fibrosis hepática es un proceso de cicatrización resultado del mal crónico en el hígado, de la acumulación progresiva del colágeno y la falta de reestructuración de colágeno en la matriz extracelular (Gulsum, 2014).

La matriz extracelular es una compleja red de proteínas y polisacáridos que junto con las células forma el tejido. Las macromoléculas que componen la MEC son secretadas por las mismas células residentes, por lo que se genera una interacción muy cercana entre la superficie de las células productoras y la matriz. Ésta no sólo provee de soporte físico, sino que regula el comportamiento de las células, influenciando la supervivencia, el desarrollo, la migración, la proliferación, la forma y las funciones (Novo, Cannito, Paternostro, Bocca, Miglietta y Parola, 2004).

La fibrosis puede acompañar cualquier enfermedad crónica del hígado que se caracterice por una patología hepatobiliar o inflamación; comúnmente surge como consecuencia de hepatitis crónica por virus C o virus B, por consumo excesivo de alcohol y esteatohepatitis no alcohólica, pero también puede aparecer debido a enfermedades parasitarias, metabólicas o autoinmunes y ante condiciones de inflamación crónica, entre otras patologías (Gressner, Weiskirchen, Breitkop y Dooley, 2002).

Composición de la matriz extracelular hepática

En el hígado sano hay un balance cuidadosamente regulado entre la producción de matriz extracelular y su degradación; este balance se altera con la fibrosis, afectando tanto la cantidad como la composición de dicha matriz (Novo *et al.*, 2004).

La matriz del espacio de Disse en un hígado normal se compone principalmente de colágeno tipos IV y VI. Con daño hepático, esta matriz se reemplaza por colágena fibrilar, es decir, colágeno tipo I y III; además, se acumulan proteínas como fibronectina, elastina y proteoglicanos, entre otras. Las metaloproteinasas de matriz (MMPs), así como los inhibidores tisulares de metaloproteinasa (TIMPs), son agentes esenciales en la regulación de la producción de la MEC. Los diferentes tipos de MMPs pueden degradar diversos componentes de la matriz extracelular, además de otras proteínas (Gressner *et al.*, 2002).

Los cambios estructurales que sufre la MEC durante la fibrosis están dirigidos principalmente por las CEH, lo que crea un impedimento físico y funcional para el flujo bidireccional de señales entre las sinusoides y los hepatocitos, y contribuye a la pérdida de la función. Además, la acumulación de matriz extracelular produce una retroalimentación positiva, activando receptores en la membrana de las células del hígado que amplifican la señal fibrogénica para generar más MEC (Ozlem, 2014).

En la comunicación entre la MEC y las células contiguas son importantes las integrinas -proteínas en la membrana que interactúan directamente con la matriz extracelular- y las citocinas -proteínas responsables de la comunicación intercelular-. Entre las citocinas que juegan un papel primordial en el proceso de fibrosis se encuentran el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). TGF- β es la citocina con mayores efectos fibrógenicos para las células estelares hepáticas, mientras que PDFG es el mitógeno (promotor de mitosis) más potente (Gressner *et al.*, 2002).

Mecanismos de fibrosis hepática

La fibrosis hepática es inicialmente un proceso dinámico y complejo como consecuencia de un desequilibrio entre la fibrogénesis y la fibrinólisis, decantándose en favor del primer proceso y dando como resultado una evolución fibrótica y acumulación de MEC, y, por tanto, una destrucción en la arquitectura del hígado. Durante este proceso la identificación de las células estelares hepáticas activadas ocupa un papel relevante, al mantener un fenotipo miofibroblasto, posteriormente se desencadenan una serie de eventos discretos en el comportamiento celular, como la contractilidad, quimiotaxis, fibrogénesis, disminución en la concentración de vitamina A, proliferación, degradación de la matriz y liberación de quimiocinas,

que darán como resultado la acumulación de matriz extracelular (Garzon, Marcucci y Croce, 2010).

Durante la fibrogénesis existe un intercambio de colágeno tipos IV y VI (componente principal del hígado normal), sustituido progresivamente por colágeno tipos I y III en el espacio de Disse. A continuación, presentamos algunos factores implicados en el proceso de fibrosis (Sahin, Trautwein y Wasmuth, 2010).

La leptina es una adipoquina implicada en la fibrogénesis, su efecto se ve modificado río abajo en su vía de señalización durante la lesión hepática, lo que conduce a un aumento en la secreción de TGF- β 1 por parte de las células de Kupper (Rao, Klein, Bonar, Zielonka y Mizuno, 2010).

El TGF- β 1 es una proteína inactiva unida a un péptido de latencia; sin embargo, al ser activada por factores externos, sus receptores afines a proteínas Smad inducen a la producción de colágeno. Al permanecer en constante secreción, estimula a las HSCs a trans-diferenciarse en miofibroblastos, los cuales secretan de manera continua matriz extracelular. Ante un daño agudo, TGF- β 1 regula el proceso de regeneración de hepatocitos; debido a sus funciones antiinflamatorias y de crecimiento, será un reto antagonizar terapéuticamente su secreción (Teixeira-Clerc, Belot, Manin y Deveaux, 2010).

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF / CCN2) es una proteína secretada por las HSCs ante un daño ocasionado por etanol; esta proteína es una señal fibrogénica independiente de TGF- β que puede ser útil como biomarcador e identificar la gravedad de la fibrosis (Bomble, Tacke, Rink, Kovalenko y Weiskirchen, 2010).

Interacción inmunológica

Durante la fibrogénesis, la respuesta inflamatoria persiste debido a la secreción constante de citocinas inflamatorias por medio de las CEHs; estas citocinas posteriormente interactúan con las células del sistema inmune, mediante la expresión de moléculas de adhesión. Tal interacción da como resultado una modulación inmunitaria a través de la presentación de

antígenos; por lo tanto, existe una retroalimentación positiva entre las células fibrogénicas y aquellas que expresan factores inflamatorios en la amplificación de la fibrosis (Adachi *et al.*, 2007).

La fibrosis hepática es una patología característica de diversas enfermedades crónicas del hígado; un evento fisiopatológico clave es la activación de las CEH, el cual implica que las células quiescentes se vuelvan altamente proliferativas, expresando diversos factores profibrogénicos que conducen a la deposición de proteínas de matriz extracelular, comprometiendo finalmente a la función hepática. Por lo anterior, la investigación sobre estas células puede identificar nuevos enfoques prometedores en el tratamiento contra la fibrosis hepática (Friedman, 2008; De Minicis *et al.*, 2012).

Bibliografía

- Adachi, M., Osawa, Y., Uchinami, H., Kitamura, T. y Accili D. (2007). The forkhead transcription factor FoxO1 regulates proliferation and transdifferentiation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 132(4), 1434-1446.
- Bomble, M., Tacke, F., Rink, L., Kovalenko, E. y Weiskirchen, R. (2010). Analysis of antigen-presenting functionality of cultured rat hepatic stellate cells and transdifferentiated myofibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2), 342-347.
- Borkham, E., Roeyen, C. R. y Ostendorf, T. (2007). Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J. Hepatol.*, 46, 1064-1074.
- Brow, M. y Sacks, D. (2008). Compartmentalised MAPK Pathways. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 186, 205-235.
- De Minicis, S., Candelaresi, C., Agostinelli, L., Taffetani, S., Saccomanno, S., Rychlicki, C., Trozzi,

- L., Marzioni, M., Benedetti, A. y Svegliati-Baroni, G. (2012). Endoplasmic reticulum stress induces hepatic stellate cell apoptosis and contributes to fibrosis resolution. *Liver International*, 32(10), 1574-84.
- De Oliveira, S., Ramos, L. y Morales, K. (2017). Molecular interplays in hepatic stellate cells: apoptosis, senescence, and phenotype reversion as cellular connections that modulate liver fibrosis. *Cell Biology International*, 41, 946-959.
- Fausto, N., Campbell, J. S. y Riehle, K. J. (2006). Liver regeneration. *Journal of hepatology*, 43(2S), 45-53.
- Friedman, S. L. (2004). Stellate cells. A moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatology*, 40, 1041-1043.
- Friedman, S. L. (2008). Liver Fibrosis from bench to bedside. *Journal of hepatology*, 38(15), 38-53.
- Fujiyoshi, M. y Osaki M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. (2011). *J Hepatobiliary Pancreat. Sci.*, 18(1), 13-22.
- Garzon, R., Marcucci, G. y Croce, C. M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature reviews*, 9(10), 775-789.
- Gressner, A., Weiskirchen, R., Breitkop, K. y Dooley S. (2002). Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 7(6), 62-76
- Gulsum, O. (2014). Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World Journal of Gastroenterology*, 20(23), 7260-7276
- Hernández, V. y Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 6, 425-456.
- Krasilnicov, M. A. (2000). Phosphatidylinositol-3 Kinase Dependent Pathways: the role in Control of Cell Growth, Survival, and Malignant. *Biochemistry*, 65, 59-67.
- Malarkey, D. E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G. y Maronpot, R. (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathology*. 33, 27-34.
- Novo, E., Cannito, S., Paternostro, C., Bocca, C., Miglietta, A. y Parola, M. (2004). Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogénesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 548, 20-37.
- Sahin, H., Trautwein, C. y Wasmuth, H. E. (2010). Functional role of chemokines in liver disease models. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7(12), 682-690.
- Schindler, C. y Plumleec, C. (2008). Inteférons pen the JAK-STAT pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 19, 311-318.
- Senoo, H. (2004). Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc.*, 37, 3-15.
- Rao V., Klein, S. R., Bonar, S. J., Zielonka, J. y Mizuno, N. (2010). The Antioxidant Transcription Factor Nrf2 Negatively Regulates Autophagy and Growth Arrest Induced by the Anticancer Redox Agent Mitoquinone. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 34447-34459.
- Teixeira-Clerc, F., Belot, M. P., Manin, S. y Deveaux, V. (2010). Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. *Hepatology*, 52(3), 1046-1059.
- Weiskirchen, R. y Tacke, F. (2014). Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 3(6), 344-363.
- Wells, G. B. (2008). Structural answers and persistent questions about how nicotinic receptors work. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 5479-5510.

Melisa e Itzel Sánchez Méndez: semilla artística local que florece y da fruto

Itzel Melinda Sánchez Méndez nació en la ciudad de Oaxaca, donde empezó a estudiar artes plásticas desde el bachillerato y posteriormente, de manera profesional, en la Universidad Veracruzana, donde cursó la especialidad en pintura. Al poco tiempo de egresar, retornó a su ciudad natal para laborar en la Escuela de Bellas Artes, en el programa de la Instructoría en Artes Plásticas, misma en la que anteriormente estudió y que fue parte de su formación, razón por la que le tiene un aprecio profundo. En esta institución ha laborado durante casi 10 años, pues le resulta gratificante devolver parte de lo aprendido en la licenciatura en Artes Plásticas de la UV. Asimismo, ha tomado algunos cursos, como el taller de Litografía impartido por Per Anderson en la "Ceiba grafica", en Coatepec, Veracruz, y el curso de Encausto en frío, impartido por Saúl Castro, en la ciudad de Oaxaca.

De acuerdo con el artista veracruzano Manuel Velázquez, la producción de Itzel Sánchez es "introspectiva, devela aspectos diversos de la condición humana e invitan a la búsqueda de nuevos rumbos y viajes [...] Su poética fluye sobre un basamento que no rehúye a lo visual, sustentado de medio acrílicos, una técnica que le permite trabajar con fluidez, hacer arrastres y poner capas y capas hasta empastar sin

límites". Es así que ha encaminado su obra sobre la fluidez y los empastes. A través de diversas exposiciones individuales y colectivas en la ciudad y el país se ha podido apreciar parte de lo que aquí sucintamente se describe.

Por su parte, Lizet Melisa Sánchez Méndez inició sus estudios en las artes durante el bachillerato de educación artística "Miguel Cabrera". Motivada y apoyada por sus padres, cursó en la Universidad Veracruzana la licenciatura en Artes Plásticas, donde conoció a maestros como Per Anderson y Manuel Velázquez, a quien admira por su labor docente y trabajo artístico. Asimismo, tuvo la oportunidad de irse de intercambio a la Escuela Nacional de Artes Plásticas (ahora Facultad de Artes y Diseño), donde convivió con profesores que trabajan con métodos tradicionales, por lo que se sintió atraída a emplear técnicas como tintas, temple, encausto, óleo y mixtas. De vuelta a Oaxaca, empezó a desarrollar su obra, al tiempo que se integró a la plantilla docente de la licenciatura en Artes Plásticas y Visuales de la Escuela de Bellas Artes, en ese entonces de la UABJO. A lo largo de su carrera ha participado en algunos proyectos colectivos, pero también de forma individual, por lo que ahora tiene parte de su producción expuesta en algunos espacios del centro de Oaxaca.

Itzel Sánchez.
"Mayo primaveral",
acrílico sobre tela,
140x200 cm
2017.



Itzel Sánchez.
"Días de fiesta",
acrílico sobre tela
140x120 cm
2017.



Melisa Sánchez Méndez.
"Serie de peces I",
En causto/tela,
40x40 cm,
2016.



Melisa Sánchez Méndez.
"Ultramar",
Mixta/papel,
25x35 cm,
2016.



Melisa Sánchez Méndez.
"Prusia",
Mixta/papel,
25x35 cm,
2016.



Melisa Sánchez Méndez.
"Serie de peces II",
Medio encausto/tela,
40x40 cm,
2016.



Melisa Sánchez Méndez.
"Serie de peces II",
Encausto/tela,
40x40 cm,
2016.

Normas editoriales para publicar en **TEQUIO**

TEQUIO. *Revista Interdisciplinaria de Investigación e Innovación* es una publicación cuatrimestral, editada y distribuida por la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.

Objetivo

Ser un espacio para difundir entre la comunidad universitaria y el público en general la investigación, las reflexiones teóricas y el conocimiento científico que se genera en diversas áreas del saber, en contextos regionales, nacionales e internacionales, desde una perspectiva interdisciplinaria de investigación e innovación.

¿Quiénes pueden participar?

La convocatoria está dirigida a investigadores de las diferentes áreas del conocimiento, de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca y de la comunidad científica de México y el mundo.

TEQUIO recibe artículos originales e inéditos bajo convocatoria anual, por lo que los autores que contribuyan en ella deberán ajustarse a las siguientes normas:

1. La revista aceptará trabajos escritos en español o inglés, cuando sea la lengua nativa de los autores y/o tengan una lengua nativa diferente al español.

2. Los archivos deberán enviarse en formato Word 97-2013, en hoja tamaño carta, fuente Times New Roman de 12 puntos, con una extensión de 12 a 15 cuartillas (páginas), numeradas, al igual que los renglones. Los márgenes de la página deben ser de 2.5 cm para el superior e inferior, y 3 cm para los lados derecho e izquierdo, con un interlineado de 1.5.

3. En la redacción se respetarán las normas internacionales relativas a las abreviaturas, a los símbolos, a la nomenclatura anatómica, zoológica, botánica, química, a la transliteración terminológica, sistema de unidades, etcétera.

4. Todo trabajo deberá incluir las siguientes secciones, con las características especificadas.

4.1 En la primera página:

a. Título del trabajo en español e inglés. El título deberá ser tan corto como sea posible, siempre que contenga las palabras clave del trabajo, de manera que permita identificar la naturaleza y contenido de éste, aun cuando se publique en citas e índices bibliográficos. No se deben utilizar abreviaturas.

b. Nombre completo del o los autores, iniciando con el (los) nombre(s), apellido paterno apellido materno ejemplo: Andrés Hernández Scandy, Mariana Tafoya-Parra. El autor de correspondencia debe estar identificado con un asterisco e incluir su correo electrónico.

c. Institución a la que representan, sin abreviaturas y la dirección completa de la misma (en una nota a pie), especificando el país.

4.2 Resumen y abstract con un máximo de 250 palabras. A continuación de cada resumen se anotarán de tres a cinco palabras o frases cortas-clave (Key words), que ayuden a clasificar el artículo.

4.3 Notas a pie de página: a 10 puntos con las mismas características que el cuerpo del texto, deberán ser únicamente aclaratorias o explicativas, sólo servirán para ampliar o ilustrar lo dicho en el cuerpo del texto.

4.4 El trabajo puede incluir fotografías, gráficos, cuadros y mapas que ilustren el contenido, en el texto se debe mencionar dónde se insertarán las mismas y deberán enviarse por separado de manera electrónica y con sus respectivas fuentes de información.

4.5 Se recomienda presentar cada cuadro y figura en hojas separadas; los cuadros deberán estar numerados, tener título o leyenda explicativa, de manera que se comprendan por sí mismos sin necesidad de leer el texto.

a. Se entiende por cuadro al conjunto de nombres, cifras u otros datos presentados ordenadamente en columnas o

renglones, de modo que se advierta la relación existente entre ellos. Deberán ser enviados en archivos individuales, en formato Word, con líneas horizontales y verticales, a fin de que pueda corregirse la ortografía o modificar su tamaño.

b. Las figuras (gráficas, dibujos, etcétera) deberán enviarse en los programas Excell para Windows, Corel Draw o Harvard Graphics, y presentarse en archivos individuales con el número progresivo correspondiente y pie de figura que la explique.

c. Las fotografías deberán ser enviadas en archivos individuales con alta resolución (300 pixeles por pulgada), en formatos gif; tiff, jpg. Se deben especificar los diámetros de aumento en las microfotografías que se incluyan.

4.6 Citas y referencias: al final del texto, las referencias deben separarse de acuerdo con el tipo de material que se consulta:

bibliografía, hemerografía, referencias electrónicas, etcétera, en orden alfabético.
La forma de citar dentro del texto se apegará al formato APA 2016: entre paréntesis se anotará el primer apellido del autor o autores, separado con una coma del año de la publicación citada, luego una coma y la abreviatura "p.", y enseguida la página de donde fue tomada la cita: (Castañón, 2014, p. 25).

En caso de que sólo se mencione algún trabajo de otro autor o no se trate de una cita textual, se deberá anotar de esta forma: (Castañón, 2014) o bien dentro de la redacción: Como afirma Castañón (2014)...

Las referencias se consignarán de la siguiente forma:

Artículo impreso:

Apellido, A. A., Apellido, B. B. & Apellido, C. C. (Año). Título del artículo. *Título de la publicación*, volumen (número), pp-pp.

Libro:

Apellido, A. A. (Año). *Título*. Ciudad: Editorial.

Capítulo de libro:

Apellido, A. A. & Apellidos, A. A. (Año). Título del capítulo. En A. A. Apellido (Ed., Coord., etc.), *Título del libro* (pp-pp). Ciudad: Editorial.

Versión electrónica de libro impreso:

Apellido, A. A. (Año). *Título*. Recuperado de <http://www.ejemplo.com>

Simposios y conferencias:

Apellido, A. & Apellido, A. (mes, año). Título de la presentación. En A. Apellido del Presidente del Congreso (Presidencia), *Título del simposio*. Simposio dirigido por nombre de la Institución organizadora, lugar.

Tesis:

Apellido, A. & Apellido, A. (Año). *Título de la tesis* (Tesis de pregrado, maestría o doctoral). Nombre de la institución, lugar. Recuperado de www.ejemplo.com

5. La comisión editorial enviará los artículos que reciba a arbitraje con dos pares externos de reconocido prestigio nacional e internacional.

6. Si el artículo fue aceptado con correcciones y/o adaptaciones, éste deberá ser devuelto corregido a la revista en un plazo no mayor a 15 días naturales.

7. El dictamen final será inapelable. Los autores serán contactados vía correo electrónico.

8. **TEQUIO** solicitará una carta firmada por todos los coautores, en la que declaren estar de acuerdo con que su artículo sea publicado en la revista. En caso de ser coautores, indicarán en qué consistió su participación.

9. Los artículos contenidos en esta revista serán responsabilidad exclusivamente de los autores.

10. Cualquier circunstancia no contemplada en la presente convocatoria será resuelta por el Consejo editorial de **TEQUIO**.

Tequio

Revista de Divulgación, Investigación e Innovación



Tequio está licenciada por UABJO bajo Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 2.5 México License. En caso de copiar, distribuir o comunicar públicamente la obra, favor de notificar al correo: publicacionesuabjo2016@gmail.com y citar la fuente.