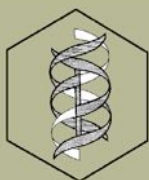


Revista de Educación Bioquímica

REB 2016



Órgano de información de la
Asociación Mexicana de
Profesores de Bioquímica, A.C.



Asociación Mexicana de
Bioquímica, A.C.

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNAM

Facultad de Medicina



EDITADO DESDE 1982 COMO BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

COMITÉ EDITORIAL

EDITOR EN JEFE

JOSÉ VÍCTOR CALDERÓN SALINAS

Departamento de Bioquímica
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

EDITORES

RAFAEL CAMACHO CARRANZA

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Medicina, Genómica y Toxicología Ambiental
Universidad Nacional Autónoma de México

ALICIA GAMBOA DE BUEN

Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México

MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

MARÍA ESTHER REVUELTA MIRANDA

Sección Bioquímica y Farmacología Humana
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA

Instituto Nacional de Pediatría

VÍCTOR M. VALDES LÓPEZ

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

ÁNGEL ZARAIN HERZBERG

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

EDITORES FUNDADORES

GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
e Instituto Politécnico Nacional

JESÚS MANUEL LEÓN CÁZARES

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

ENRIQUE PIÑA GARZA

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

YOLANDA SALDAÑA BALMORI

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

CORRESPONSALES

ROCÍO SALCEDA SACANELLES

Coordinadora
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

ALEJANDRO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Instituto de Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua

SERGIO SÁNCHEZ-ARMÁSS ACUÑA

Departamento de Fisiología y Farmacología
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

MARTHA ANGÉLICA QUINTANAR ESCORZA

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina Humana, Universidad Juárez del Estado de Durango

MARÍA MALDONADO VEGA

Departamento de Investigación. Centro de Innovación Aplicada en
Tecnologías Competitivas, AC. León, Gto., Mexico

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos Periódica, Iresie, Redalyc, Latindex y SCIELO.

REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB), Volumen 35, Número 3, septiembre de 2016, publicación trimestral, editada por Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C., Avenida Universidad No. 3000, Colonia Universidad Nacional Autónoma de México, Delegación Coyoacán, C.P. 04510. Ciudad de México, México. Correspondencia: Apartado Postal 70-281, Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México. Correo E: reb@bq.unam.mx
<http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/Reb/HomePage>
http://www.facmed.unam.mx/marco/index.php?dir_ver=101
Editor responsable Dr. José Víctor Calderón Salinas. ISSN: 1870-3690. Reserva de derechos al Uso Exclusivo No. 04-2015-113014523300-203, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Diseño: Celia Virginia Sánchez Meza, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en septiembre de 2016.
El contenido de los artículos y las opiniones expresadas en ellos son responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente las del Comité Editorial. Se autoriza la reproducción parcial o total de los textos aquí publicados siempre y cuando se cite la fuente completa y la dirección electrónica de la publicación.

CONTENIDO

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL

LOS PROBLEMAS EN LOS ESTUDIOS
DE LOS EFECTOS BENÉFICOS DE LOS
ANTIOXIDANTES
EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
Rafaela Natividad Cosío Vital,
Carlos Cruz Cortés y
José Víctor Calderón Salinas53

ARTÍCULOS

NUEVOS E INESPERADOS MECANISMOS DE
BIOGÉNESIS Y ACCIÓN DE LOS microRNAs
Ruth Ruiz Esparza Garrido y
Miguel Ángel Velázquez-Flores.....55

LA PARADOJA DEL USO DE ANTIOXIDANTES
DURANTE EL TRATAMIENTO CONTRA EL
CÁNCER:
¿PROTEGER AL ORGANISMO DE LOS
EFECTOS TÓXICOS DE LOS
ANTINEOPLÁSICOS DISMINUIRÍA
LA EFICACIA FARMACOLÓGICA PARA
EVITAR EL DESARROLLO DEL CÁNCER?
Laura Guerrero Medrano,
María Maldonado Vega y
José Víctor Calderón Salinas.....71

OTRAS COMUNICACIONES

CRUCIBIOQ
CINÉTICA ENZIMÁTICA
Yolanda Saldaña Balmori.....89

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ
CINÉTICA ENZIMÁTICA
Yolanda Saldaña Balmori.....92

INSTRUCCIONES PARA LOS
COLABORADORES DE LA REVISTA DE
EDUCACIÓN BIOQUÍMICA.....93

EDITORIAL

LOS PROBLEMAS EN LOS ESTUDIOS DE LOS EFECTOS BENÉFICOS DE LOS ANTIOXIDANTES EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES

En la actualidad existen numerosos productos en el mercado que se ofrecen como fármacos o complementos alimenticios antioxidantes, sin embargo persiste la pregunta ¿Cómo saber si realmente son benéficos en el tratamiento de alguna enfermedad? Para ello, la comunidad científica realiza numerosos estudios, a partir de los cuales se pretende dilucidar si los antioxidantes son efectivos como prevención o tratamiento correctivo de algunas enfermedades o pueden ser coadyuvantes en la prevención de efectos secundarios de fármacos como antibióticos o quimioterapia contra el cáncer.

En el desarrollo de estos estudios, los investigadores enfrentan diversas problemáticas inherentes a los experimentos, pero también una dificultad para establecer criterios adecuados y generales, tales como: la elección del o de los antioxidantes a probar, el modelo de trabajo, la forma de inducir la enfermedad, la exposición o el proceso oxidante en cuestión, las dosis, las vías de administración y los indicadores de daño para evaluar la respuesta oxidante, entre otras.

Elegir el antioxidante para los estudios es un problema de origen ¿qué tipo de sustancia? ¿Usar una sustancia pura, una combinación de sustancias o un extracto vegetal o animal?, cada uno con diferentes variables, pros y contras que pueden afectar los resultados y las conclusiones de los estudios. Existen sustancias cuya actividad antioxidante está determinada por un isómero específico y otro isómero no presenta actividad o bien produce respuestas contrarias, lo que complica el estudio y el uso de mezcla racémica. Otros factores que pueden afectar los resultados son la especie de la que proviene el compuesto antioxidante y la presencia de micro-contaminantes que alteren las pruebas; de igual forma las condiciones de traslado, de almacenamiento y forma de utilización, pueden reducir su capacidad antioxidante, éste puede oxidarse y formar productos variados que no permiten estandarizar los resultados.

El vehículo empleado para la disolución o suspensión es otro punto a considerar, ya que de ello depende su absorción y estabilidad. También la vía de administración es un factor que debe tomarse en cuenta por la velocidad y fracción de absorción.

Los extractos vegetales implican un mayor número de variables: diferencias en la fuente del extracto que incluye la forma en la que son cosechadas y el tiempo en que son cortadas, la especie de las que se hace el extracto, los procesos de extracción, la purificación y concentración que se alcanza, entre otros factores. Un ejemplo de ello es la vitamina E comercial, la cual contiene un número y composición indeterminada de estereoisómeros de los tocoferoles, que varían en tipo y concentración dependiendo del origen de la extracción (vegetales o animales) y el proceso de purificación que tienen efectos diferentes, aun en sus propiedades antioxidantes elementales, más aun en efectos biológicos complejos.

Por otra parte, la elección del modelo de estudio es todo un reto ya que hay una respuesta particular en un modelo molecular, celular, animal y por supuesto en humanos. La administración de antioxidantes en cultivos celulares difiere mucho a su administración a un modelo animal. En sistemas en cultivo se emplean concentraciones muy altas y por lo tanto no fisiológicas o farmacológicas, no hay un metabolismo general de las sustancias y el vehículo donde se resuspende el antioxidante puede tener efectos significativos.

En el caso de animales de laboratorio, las vías de administración más frecuentes y efectivas son la intraperitoneal y la intragástrica, la administración en el agua de bebida o en el alimento tiene notables variaciones en la dosis absorbida, pero es la más frecuentemente usada en humanos, lo cual conlleva a aplicar más variables al modelo ya que es diferente la digestión, la absorción, la distribución,

el metabolismo y la redistribución de metabolitos secundarios.

En el caso de los estudios en humanos, se tiene que considerar adicionalmente a lo antes mencionado, la voluntad del paciente, el apego al tratamiento, las respuestas secundarias indeseables y las reglamentaciones éticas, ya que el uso de antioxidantes frente a algunas enfermedades pudiera afectar la efectividad de los tratamientos y en el caso de haberse demostrado que algunas enfermedades pueden ser tratadas conjuntamente con antioxidantes de una manera satisfactoria, la utilización de un grupo placebo se tiene que justificar ampliamente.

Los problemas no se acaban, ya que diferentes modelos incluyen también diferentes parámetros para evaluar la respuesta antioxidante y existe dificultad para hacer una comparación sistemática y efectiva entre las respuestas en los diferentes modelos. No se puede asegurar la efectividad de un tratamiento en humanos sólo porque ya fue exitoso en un modelo celular o animal. Es complejo establecer respuestas reproducibles y generales ya que el proceso farmacológico individualizado de la biodisponibilidad, la dosis, el tiempo de administración, la frecuencia, la temporalidad en relación a la evolución del proceso patológico, la digestión, la absorción, la distribución, el metabolismo, la redistribución y la excreción aumentará más variables a los estudios y será aún más complicado su análisis si en cada estudio se eligen diferentes pruebas de daño o de oxidación o de respuesta antioxidante, para determinar la efectividad del tratamiento. Es indispensable entonces establecer métodos de evaluación que permitan homologar los procedimientos y que los resultados se conviertan en índices de normalidad o anormalidad, ya que las pruebas actuales proporcionan resultados muy variados, es entonces necesario agregar estudios sistematizados y estandarizados, marcadores tempranos y con mayor especificidad, para poder hacer comparaciones de los efectos entre los diversos experimentos y resultados. Acumular información que permita concluir y lograr acuerdos y resultados

totalmente reproducibles, que hagan frente a la inherente variabilidad biológica que enfrentan los pacientes y las distintas enfermedades.

Existen criterios para definir cuáles enfermedades pueden ser candidatas a tratarse con antioxidantes: debe existir un componente oxidante en el curso de la enfermedad; tener una correlación entre la formación de especies reactivas con el daño producido; identificar el agente oxidante y reproducir el daño usando otros agentes oxidantes; que al retirar el agente oxidante se reduzca el daño. Hay trabajo continuo de investigación para detectar las enfermedades que puedan cumplir estos criterios e iniciar su tratamiento con antioxidantes. Sin embargo, existen serias dificultades para poder determinar estos criterios, debido a que frecuentemente no es posible reproducir la enfermedad a cabalidad en modelos animales o no se puede estudiar en los tiempos y condiciones adecuados en los pacientes, tal es el caso de la diabetes, la hipertensión y el cáncer por mencionar solo algunas.

El estudio de los antioxidantes es un proceso sumamente complejo, y aunque hay evidencias clínicas que avalan el uso de éstos como auxiliar en el tratamiento médico es todavía un reto a largo plazo que precisa de más estudios, con indicadores tempranos más sensibles, que permitan valorar el efecto de los antioxidantes en el tratamiento preventivo o correctivo de muchos padecimientos.

Rafaela Natividad Cosío Vital
Departamento Bioquímica, CINVESTAV
rcosio@cinvestav.mx

Carlos Cruz Cortés
Departamento Bioquímica, CINVESTAV
carloscruz@cinvestav.mx

José Víctor Calderón Salinas
Departamento Bioquímica, CINVESTAV
Editor en Jefe
jcalder@ciinvestav.mx

NUEVOS E INESPERADOS MECANISMOS DE BIOGÉNESIS Y ACCIÓN DE LOS microRNAs*

Ruth Ruiz Esparza Garrido¹, Miguel Ángel Velázquez-Flores²

¹Catedrática CONACyT, Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XX, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México. ²Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México. Autor de correspondencia, correo E: dr.velazquez.imss@gmail.com

RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños (~22 nt) no codificantes cuya transcripción es regulada por componentes moleculares diversos. A la fecha, se conocen cuatro vías de biogénesis que dan origen a los miRNAs convencionales, mirtrones, simtrones y miRNAs delimitados por secuencias Alu. Notablemente, todos estos miRNAs ejercen su acción al incorporarse al complejo de silenciamiento inducido por RNA o RISC; no obstante, otros mecanismos de acción no se pueden descartar. Si bien la inhibición de la expresión génica es el efecto mejor caracterizado, actualmente hay evidencia que indica que los miRNAs también la pueden potenciar. Los mecanismos de acción más utilizados por los miRNAs -para regular la expresión de genes- incluyen la inhibición de la traducción y/o desestabilización del mRNA blanco; sin embargo, también se ha observado su acción a nivel transcripcional y como ligandos de los receptores similares a Toll 7 y 8. De esta forma, la divergencia en los mecanismos de biogénesis y acción de los miRNAs parecen garantizar la regulación de la expresión génica en momentos celulares específicos.

PALABRAS

CLAVE:
microRNA,
mRNA blanco,
Región
semilla,
Cuerpos P,
miRNA
circulante.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small non coding RNAs (~22 nt), whose transcription is regulated by different molecular mechanisms. To date, four pathways of biogenesis are known and originate conventional miRNAs, mirtrons, simtrons, and miRNAs flanked by Alu elements. Remarkably, all these miRNAs act in conjunction with the RNA-induced silencing complex (RISC); however, other mechanisms cannot be ruled out. While attenuation of gene expression is the best characterized effect, currently there is evidence indicating the induction of gene expression by miRNAs. The mechanisms of action used by miRNAs -to regulate gene expression- include the translation inhibition and/or the mRNA target destabilization; however, miRNA action at the transcriptional level and as ligands of the Toll-like receptors 7 and 8 has also been observed. Thus, the divergence of the mechanisms of biogenesis and action of miRNAs seem to ensure the regulation of gene expression in specific cell moments.

KEY WORDS:

microRNA,
mRNA target,
Seed region,
P bodies,
Circulating
miRNAs.

INTRODUCCIÓN

De manera opuesta a lo que se esperaba, la secuenciación del genoma humano demostró que apenas el ~1.5% de éste corresponde a regiones codificantes, mientras que el resto (~98.5%) es DNA no codificante o basura (1-2). Sin embargo, se

ha propuesto que las regiones no codificantes del genoma funcionan como guardianes de su integridad al controlar la estabilidad (3) y expresión de los genes que lo constituyen (4-6). En estas regiones se transcriben los RNAs ribosomales (rRNAs) y de transferencia (tRNAs), así como otros transcritos como son los RNAs pequeños (pRNAs), RNAs largos, transposones y pseudogenes (Tabla 1).

Tabla 1
RNAs no codificantes

RNAs no codificantes	Descripción
Transposones y retrotransposones	En conjunto, los elementos nucleares largos (LINEs; ~6,000 pares de bases) y cortos (SINEs; <500 bases) constituyen alrededor del 30% del genoma humano y sus funciones están relacionadas con la inducción de la estabilidad genómica. La transcripción de los SINEs origina RNAs de transferencia (tRNA) y ribosomales (rRNA), así como otros RNAs nucleares pequeños. Por su parte, cambios en la actividad de los LINEs se asocian con la oncogénesis y ciertos desórdenes.
Pseudogenes	A la fecha, se sabe que el genoma humano tiene ~19 mil genes. De éstos, alrededor del 1.5% codifica para proteínas. Los pseudogenes son el resultado de la duplicación génica y de eventos de retrotranscripción. Algunos de ellos se originaron por mutaciones inactivantes.
Telómeros	Son secuencias repetidas de DNA (TTAGGG; en vertebrados) que mantienen la estabilidad del genoma. El acortamiento de los telómeros se asocia con la senescencia y con un incremento en la susceptibilidad al cáncer.
RNAs pequeños	Funciones
microRNA (miRNA) Tamaño: 17-22 nt	Regulan la expresión génica al controlar la traducción y estabilidad de sus mRNAs blanco y transcripción génica. Los miRNAs circulantes pueden funcionar como ligandos de los receptores parecidos Toll TLR7 y TLR8.
RNA piwi (piRNA) Tamaño: 26-31 nt	Junto con las proteínas piwi, estos RNAs pequeños regulan epigenéticamente y post-transcripcionalmente el silenciamiento de retrotransposones y otros elementos génicos en células germinales. A diferencia de los miRNAs, los piRNAs no están conservados evolutivamente.
RNA interferente (siRNA) Tamaño: 20nt	Son moléculas de RNA de doble cadena (20-25 pares de bases) que inhiben la expresión génica por mecanismos similares a los descritos para los miRNAs. Adicionalmente, los siRNAs regulan la expresión génica al participar en la remodelación de la cromatina.
RNA nuclear (snRNA) Tamaño: ~150 nt	Están involucrados en el procesamiento "splicing" de los mRNAs y participan en la manutención de los telómeros, así como en la maduración de los snoRNAs; esto ocurre en los cuerpos de Cajal.
RNA nucleolar (snoRNA) Tamaño: 90-150 nt	Principalmente guían las modificaciones químicas de los tRNAs, rRNAs y snRNAs. Existen dos tipos de snoRNAs, los C/D –asociados con la metilación- y H/ACA –asociados con la pseudouridinilación-. Los snoRNAs pueden funcionar como miRNAs y su procesamiento puede dar origen a miRNAs.
lncRNAs Tamaño: >200 nt	Son RNAs altamente complejos que participan en la regulación génica a diferentes niveles: epigenético, transcripcional, post-transcripcional controlan el splicing y la traducción; generan endo-siRNAs y participan en el imprinting génico. Los lncRNAs que regulan la función de los miRNAs, al secuestrarlos, se conocen como lncRNAs esponja.

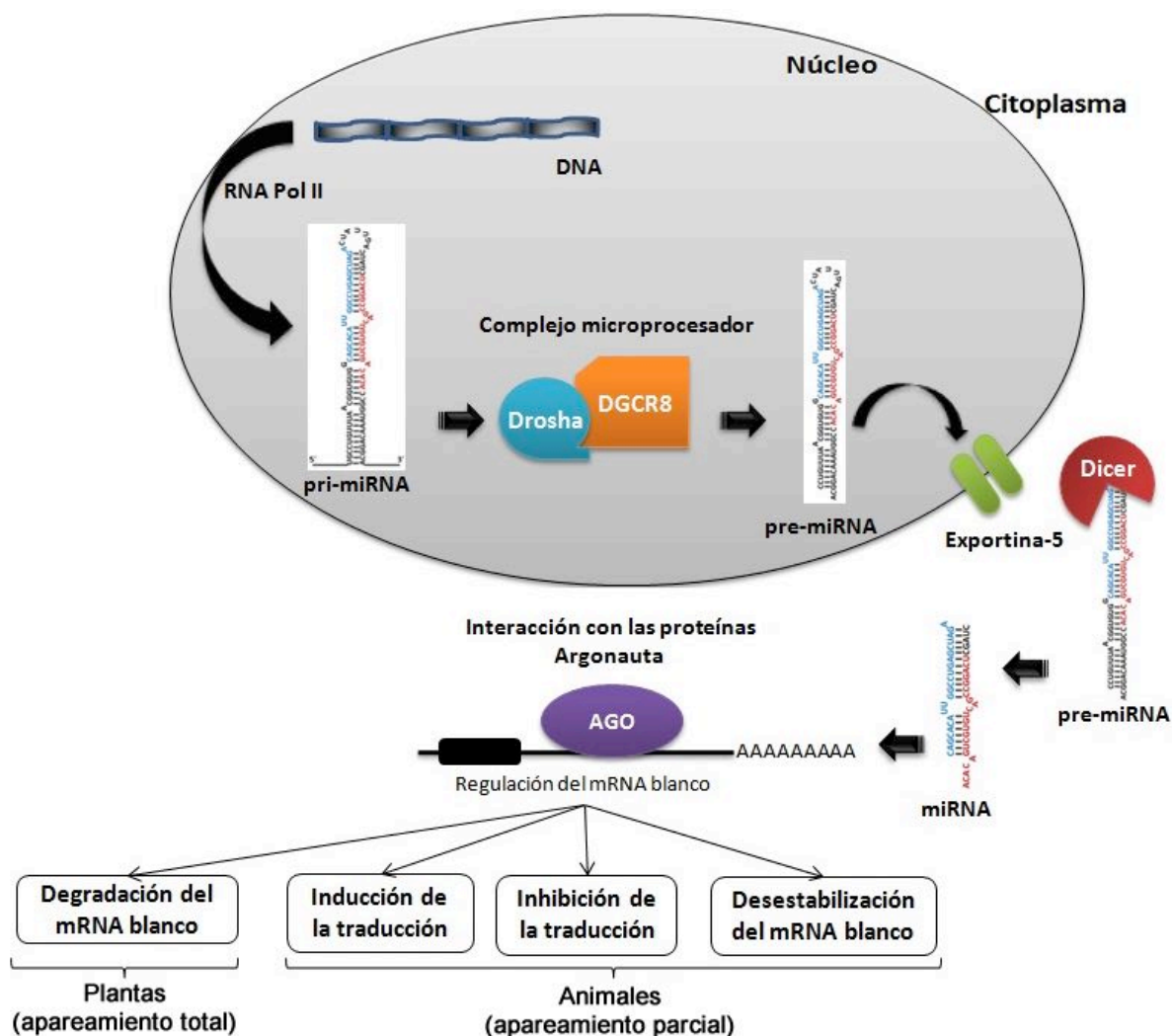


Figura 1. Biogénesis de los microRNAs convencionales. La biogénesis de la mayoría de los miRNAs está regida por la actividad de la RNA polimerasa II (pri-miRNA) y por el subsecuente procesamiento mediado por el complejo microprocesador Drosha/DGCR8 para generar al pre-miRNA. La exportación del pre-miRNA hacia el citoplasma ocurre por medio de la exportina-5 –proceso dependiente de ATP–; una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por Dicer y genera al miRNA maduro (de doble cadena). El miRNA maduro es incorporado al complejo de silenciamiento dependiente de RNA o RISC, en donde se elegirá cuál hebra, si la líder (5' → 3') o la complementaria (3' → 5'), ejercerá la regulación del mRNA blanco. En plantas el apareamiento entre el miRNA y el mRNA es total, mientras que en animales es parcial región semilla; sin embargo, existen excepciones.

Dentro de los pRNAs están los miRNAs (~22 nt), los cuales son sintetizados por medio de al menos cuatro vías biogénicas diferentes. De acuerdo a la vía de biosíntesis de la que provienen, los miRNAs se clasifican en miRNAs convencionales (vía clásica), mirtrones (originados por "splicing" alternativo) (7), simtrones "splicing-dependent mirtron" (mirtrones que no dependen del splicing) (8) y miRNAs localizados dentro de secuencias Alu (miRNAs-Alu; transcritos por la RNA polimerasa III). Independientemente de su origen, todos los miRNAs ejercen su función de manera conjunta con el complejo de silenciamiento inducido por RNA

(RISC); sin embargo, otras formas de acción para cada subtipo no se pueden descartar.

Aunque la función que mejor describe a los miRNAs es la inhibición de la traducción, actualmente está bien establecido que estos pRNAs también pueden potenciar la expresión de sus genes blanco. Los mecanismos por los que los miRNAs ejercen su función están relacionados con el control del inicio, la elongación y el término de la traducción de proteínas, así como con la regulación de la transcripción de sus genes blanco. Interesantemente, Fabbri y cols. (9) demostraron que los miRNAs circulantes (extracelulares) pueden

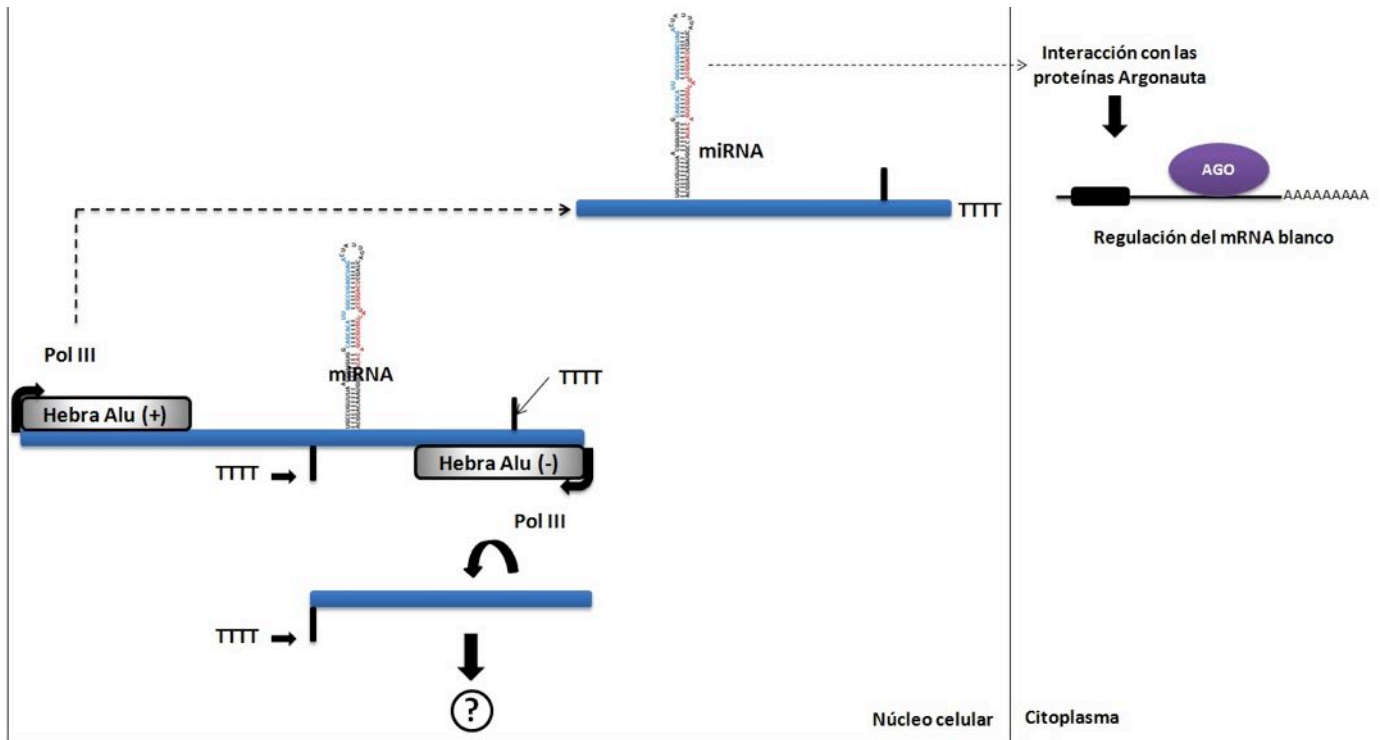


Figura 2. miRNAs delimitados por secuencias Alu. La mayoría de los miRNAs del clúster C19M están flanqueados entre secuencia Alu -hebras positivas y negativas-. La distancia en la que se localizan los miRNAs, con respecto de la secuencia Alu (-) es generalmente de 100 pb. (Tomado y modificado de referencia 15).

funcionar también como ligandos de los receptores TLR7 (Receptor similar a Toll 7) y TLR8 (Receptor similar a Toll 8), lo cual resalta la gran diversidad de mecanismos de acción por los que los miRNAs pueden controlar la expresión génica. De acuerdo a lo anterior, el objetivo de la presente revisión es describir los mecanismos de biogénesis y acción de los miRNAs menos caracterizados y con esto, hacer énfasis acerca de la complejidad que implica la regulación de la expresión de genes.

I. Biogénesis de los miRNAs

i) Vía Canónica

La vía biosintética de los miRNAs convencionales implica la generación de un transcrito primario (~70 nt) pri-miRNA, por medio de la RNA polimerasa II (Pol II), y su procesamiento posterior -por el complejo Microprocesador: Drosha (Drosha, Ribonucleasa Type III)/DGCR8 (DGCR8 Microprocessor Complex Subunit)- para generar al pre-miRNA (Fig. 1). Es importante mencionar, que el pre-miRNA generado posee dos nucleótidos salientes en el extremo 5' terminal -la cual es una marca propia de las RNAsas de tipo III- que son necesarios para su reconocimiento y exportación hacia el citoplas-

ma, por la exportina-5. Una vez en el citoplasma, el asa del pre-miRNA es procesada por DICER (Dicer 1, Ribonucleasa de tipo III) y esto permite el reconocimiento del pre-miRNA por el complejo RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA). Inicialmente se pensaba que sólo la cadena líder (5' → 3') regulaba la traducción de los mRNAs blanco; sin embargo, evidencia posterior reveló que la cadena complementaria (3' → 5') también tiene esta función (9-10).

ii) miRNAs delimitados por secuencias Alu

Diversas líneas de evidencia muestran que los miRNAs están conservados evolutivamente (12) y que el control de su expresión es dependiente de la actividad de la RNA Pol II (13). Si bien la mayoría de los miRNAs se localizan en intrones y regiones intergénicas, hay evidencia que demuestra la localización de estos RNA pequeños en elementos repetitivos de retrotransposición (14). En este sentido, Borchert y cols. (15) demostraron que ciertos miRNAs están intercalados entre repetidos Alu-retrotransposones más abundantes en el genoma- y, a diferencia de los miRNAs convencionales, éstos dependen de la actividad de la RNA Pol III (Fig. 2). Estos hallazgos extienden nuestra visión actual acerca del origen

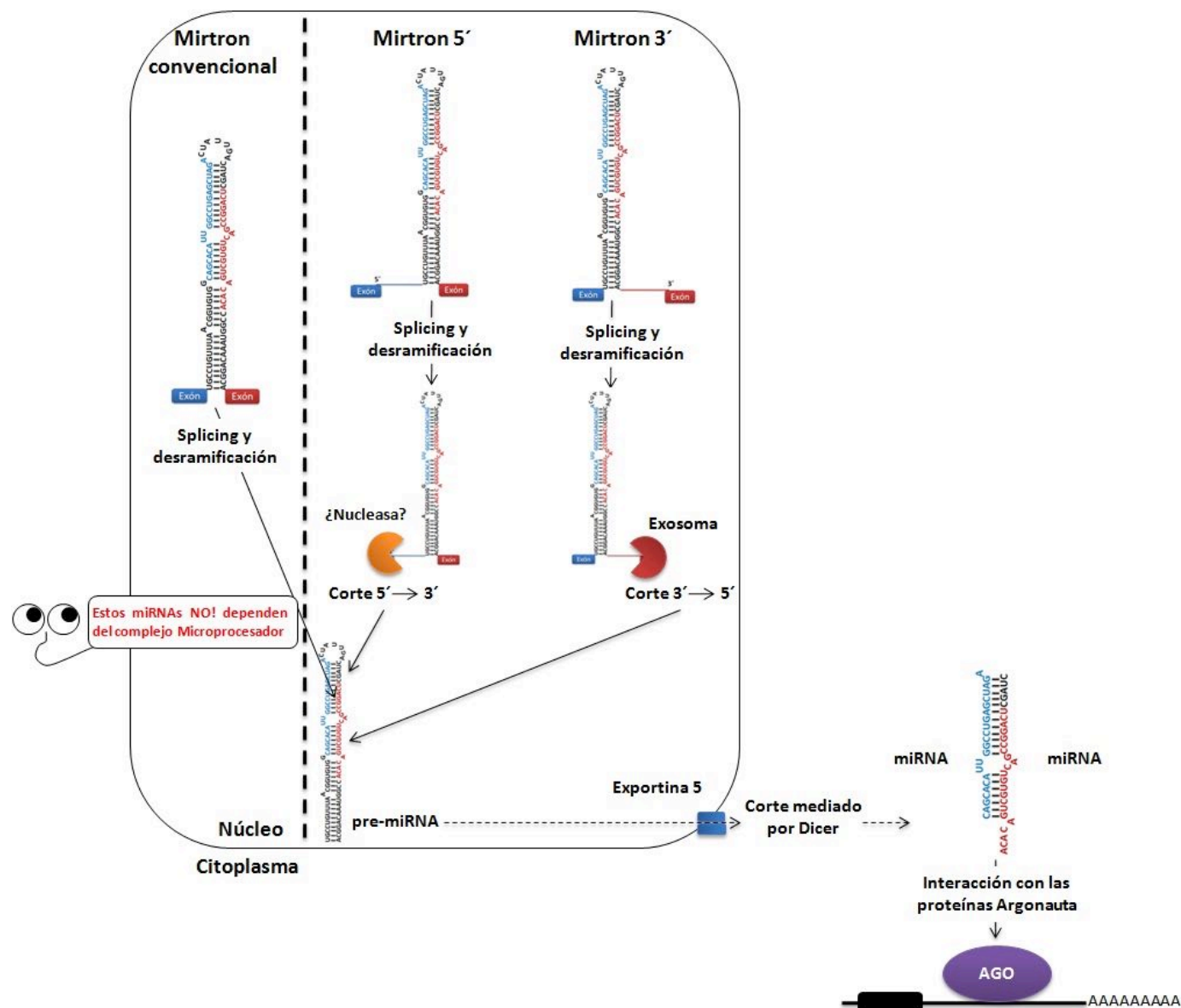


Figura 3. Mirtrones. Este tipo de miRNAs se clasifica en mirtrones convencionales y "tailed" (con extremos 5' y 3' no estructurados). El pre-miRNA de ambos tipos de mirtrones resulta del "splicing" y desramificación de intrones cortos; sin embargo, durante la biogénesis de los pre-miRNAs "tailed", es necesaria la remoción de los extremos 5' ó 3' terminales. En el caso de los mirtrones 3', se sabe que el exosoma es el encargado de remover estos extremos, mientras que para los mirtrones 5' se desconoce la enzima responsable de este proceso. (Tomado y modificado de referencia 7).

de los miRNAs y de la maquinaria que dirige su expresión.

iii) Mirtrones

Además de los mecanismos descritos anteriormente, existen miRNAs que se generan a partir de intrones de horquilla corta "short hairpin introns", los cuales se conocen como mirtrones. Este tipo de miRNAs tienen muchas de las características descritas para los miRNAs convencionales; no obstante,

hay rasgos moleculares que permiten diferenciarlos de estos últimos (Tabla 2). Los mirtrones están bien caracterizados en *Drosophila melanogaster* (*D mel*) (16) y en menor medida en otros organismos como *Caenorhabditis elegans* (*C elegans*) (16) y vertebrados (7). De acuerdo a los mecanismos que dictan su transcripción, los mirtrones se clasifican en dos subtipos: los convencionales, en donde el "splicing" define las regiones terminales 5' y 3' del pre-miRNA y los "tailed", los cuales contienen regiones 5' y 3' no estructuradas (Fig. 3). De ma-

Tabla 2
Rasgos distintivos de los mirtrones

Se generan sólo de intrones pequeños (50-120nt)
Se puede identificar muy bien el sitio del splicing y la naturaleza del extremo 3´ no apareado.
Su procesamiento es independiente del complejo Drosha/Pasha y dependiente de Dicer.

nera interesante, en *D mel* existen principalmente mirtrones 3´, mientras que en vertebrados se expresan principalmente mirtrones 5´ (Fig. 3).

iv) Simtrones

Como ya se mencionó, la biogénesis de los miRNAs canónicos requiere de los componentes del complejo Microprocesador, Drosha y DGCR8, para generar al

miRNA maduro, mientras que para la biosíntesis de los mirtrones no son necesarios; en este caso, el pre-miRNA se genera directamente del corte de los intrones por el spliceosoma y son sustratos directos de Dicer (Fig. 4). De manera inesperada, un estudio posterior demostró que los mirtrones miR-1225 y miR-1228 se producen en ausencia de "splicing" y de forma dependiente de Drosha (8). Experimentos en los que se abatió la expresión de DGCR8, de la Exportina-5 o de Argonata 2 se demostró que la biogénesis de estos miRNAs –parecidos a mirtrones simtrones- no se afecta. Por el contrario, la presencia de la forma dominante negativa de Drosha afecta considerablemente los niveles de los simtrones 1225 y 1228. Asimismo, en este estudio se demostró que los simtrones establecen interacciones con Drosha y que *in vitro*, su procesamiento depende de la actividad de Drosha. Un punto interesante, es el hecho que tanto los simtrones como los mirtrones convencionales silencian a sus mRNA blanco al interaccionar con el complejo RISC (Fig. 4). En conjunto, estos resultados revelan otra vía no-canónica de biogénesis

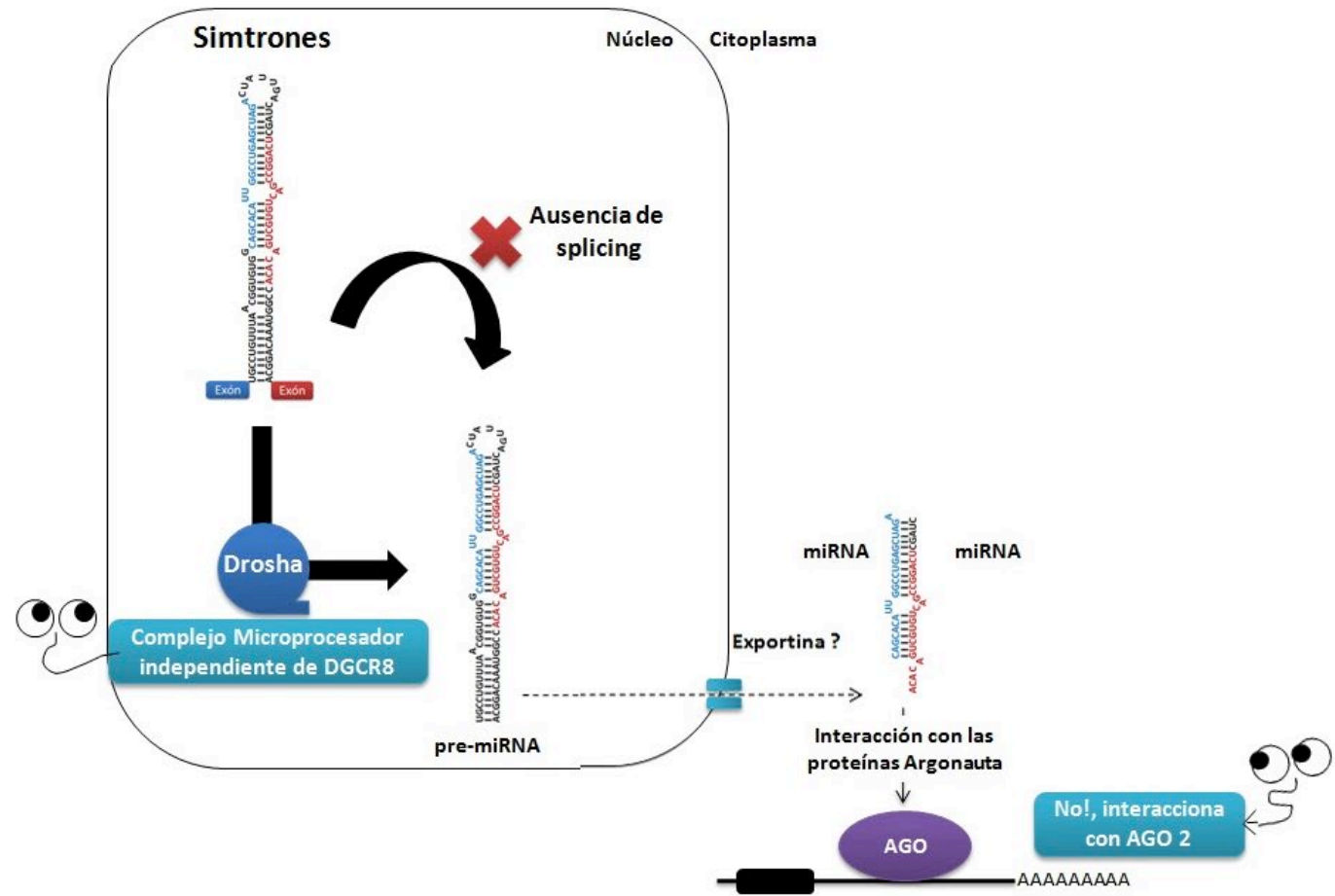


Figura 4. Simtrones. Los simtrones son mirtrones que no dependen del "splicing" y son dependientes de la actividad de Drosha. Asimismo, este tipo de mirtrones no requieren de la exportina-5 –para su exportación hacia el citoplasma- ni de AGO 2 para su incorporación al complejo RISC.

de los miRNAs que produce RNAs funcionales que regulan la expresión génica.

II. Modos de acción de los miRNAs

i) Regulación de la traducción

a) Inhibición

Los miRNAs reprimen la expresión génica por medio de varios mecanismos de acción (17). Distintas líneas de evidencia indican que los miRNAs actúan en complejos efectores que son conocidos como miRNP, miRgonauta o miRISC, en donde las proteínas Argonauta (Ago) son los constituyentes más importantes (18). El reconocimiento del mRNA blanco, por el miRNA, ocurre por un apareamiento de tipo Watson-Crick de la región semilla del miRNA (nt 2-8) con la región 3' UTR del mRNA blanco (16); no obstante, ciertos miRNAs regulan la expresión génica al aparearse con las regiones 5' uTR y/o codificantes del blanco (20-21). Importantly, la interacción miRNA-mRNA y en consecuencia, el efecto represivo de la expresión pueden alterarse en respuesta a diversos factores tales como el número de sitios blanco para un mismo miRNA, el sitio de unión del miRNA en el mRNA, la accesibilidad al sitio de unión, las secuencias que flanquean el sitio del mRNA blanco, así como la estructura secundaria del mRNA (22-24).

Actualmente, diferentes modelos se han propuesto para tratar de explicar la represión génica mediada por miRNAs, los cuales involucran mecanismos de regulación a nivel transcripcional, así como al inicio, durante y al final de la traducción. La información relacionada con el silenciamiento transcripcional inducido por RNA (RITS) es bastante pobre y sólo se sabe que ésta involucra la participación de proteínas Ago nucleares que son capaces de inducir la remodelación de la cromatina (25-26). Por su parte, los mecanismos asociados con la regulación de la traducción son mejor conocidos; sin embargo, no están del todo caracterizados. Por ejemplo, se sabe que la represión de la traducción de proteínas es controlada al degradar al mRNA blanco, debido a su deadenilación (región 3' terminal) y/o modificación de la cap (extremo 5'; "decapping"); la ausencia de la cola de poli(A) y de cap induce la degradación del mRNA por exo- y endo-nucleasas como Xrnlp y PMR1 (ribonucleasa polisomal 1), respectivamente (27-30) (Fig. 5a-b).

Durante el inicio de la traducción, la proteína Ago, constituyente del miRNP, interacciona con diversos factores que determinan el inicio de la traducción (31). Ago compete con el factor eIF4E (Factor 4E de Inicio de la traducción en eucarión-

tes), el cual dirige a los ribosomas hacia la cap del mRNA, para unirse a la estructura cap del mRNA e inhibir el inicio de la traducción (32). De igual forma, Ago regula la función de los factores PABP (proteínas de unión a la cola de poli(A)), eIF4G -interacciona con eIF4E-, eIF4A -requerido para la unión del mRNA a las subunidades ribosomales 40S- y eIF3 y eIF4, las cuales se asocian a las subunidades ribosomales pequeñas (33). También, se ha reportado que la inhibición de la traducción podría ocurrir cuando los sitios de unión del miRNA están localizados en la región 5' UTR o en secuencias codificantes del mRNA (34). Otro mecanismo que controla la inhibición del inicio de la traducción, es la participación de Ago en el control de la estructura secundaria del mRNA blanco. Existe evidencia que indica que Ago bloquea la formación de la estructura secundaria asa-cerrada que es necesaria para el inicio de la traducción. Aunque se conoce que ciertas proteínas de unión a la cola de poli(A) y cap participan en el establecimiento de la conformación asa-cerrada, los mecanismos finos se desconocen (35-36) (Fig. 5c).

Una vez que la traducción ha comenzado, Ago recluta al factor eIF6 y previene la asociación del miRNA-mRNA con la subunidad ribosomal grande (36-37) (Fig. 5d). Asimismo, el miRNP interfiere con los factores de elongación y esto conlleva a la disociación de la subunidad ribosomal y/o terminación prematura de la traducción (38) (Fig. 5e-f). Interesantemente, también se sabe que los miRNPs controlan la degradación del polipéptido nascente, el cual es degradado por la actividad de proteasas (39) (Fig. 5g).

Recientemente, se observó que los sitios de procesamiento citoplásmico cuerpos P o GW tienen una función central en la degradación de los mRNAs blanco y en la inhibición de la traducción (Fig. 5h). Los mRNAs asociados a componentes de los cuerpos P, son degradados o retenidos para su traducción posterior; esto indica que el equilibrio existente entre la expresión y la degradación de un mRNA determinado depende de la interacción de los polisomas y miRNPs con componentes específicos de estos cuerpos. Asimismo, los miRNAs y otros reguladores de la expresión génica parecen reprimir la traducción y promover el decaimiento del blanco, al reclutar componentes de los cuerpos P tales como Ago y GW182. En conjunto, estos resultados indican que los mRNAs, regulados por miRNAs, son secuestrados de la maquinaria traduccional -por componentes específicos presentes en los cuerpos P- y sometidos tanto a la degradación o inactivación para su procesamiento subsecuente (40-42) (Fig. 5h).

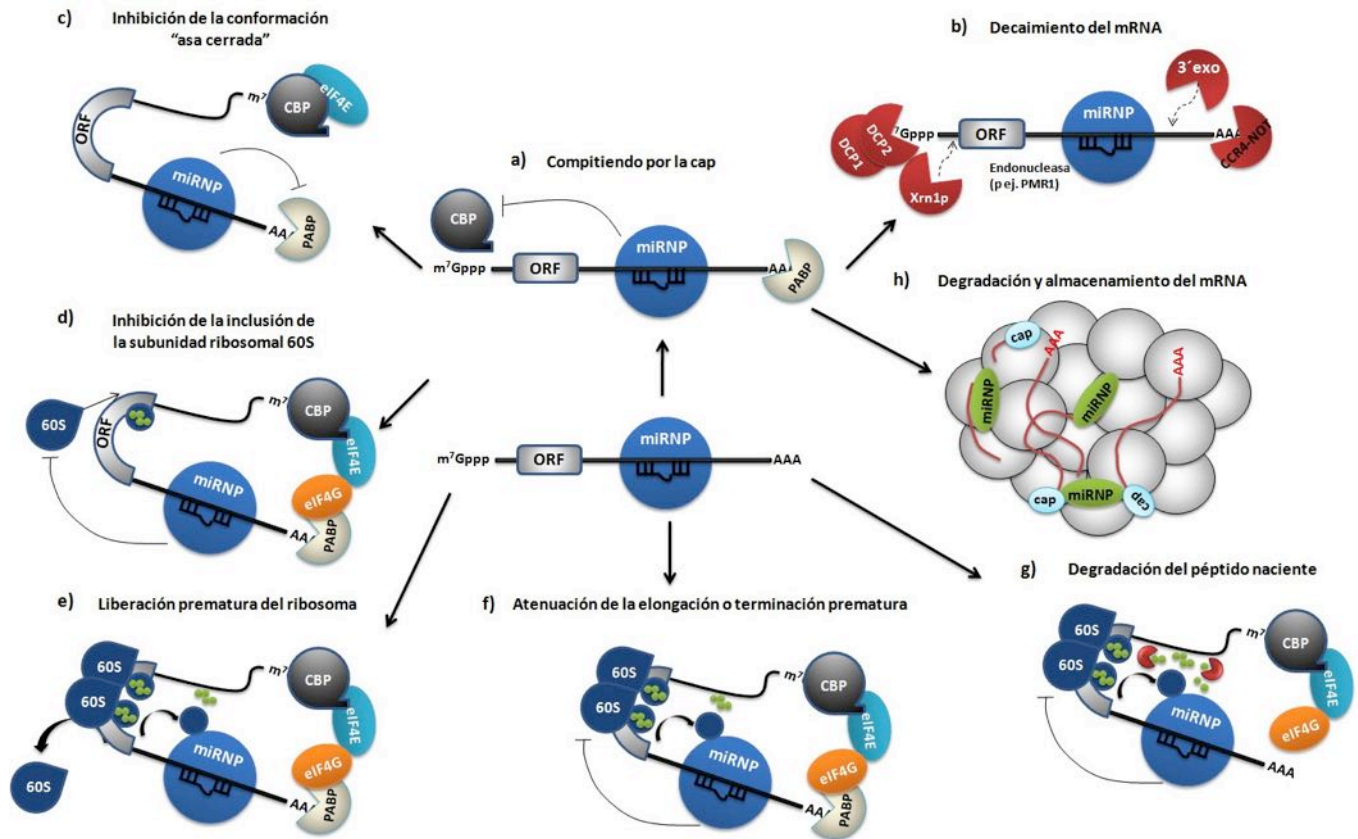


Figura 5. Los miRNAs inhiben la traducción por innumerables mecanismos. La inhibición de la expresión génica, por miRNAs, está dada por la inhibición de la traducción y/o la desestabilización de los mRNAs blanco.

b) Inducción

Como se mencionó anteriormente, la función mejor estudiada y quizás más utilizada por los miRNAs es la inhibición de la traducción; sin embargo, ciertos estudios indican que éstos también inducen la expresión de sus mRNAs blanco. En contraste a la idea que se tenía, de que los miRNAs regulan únicamente a la baja la expresión de sus mRNAs blanco –por una disminución en la estabilidad y/o en la traducción de los blancos-, Vasudevan y Steitz (43) reportaron por primera vez que la inhibición de la traducción, por los miRNAs, es reversible. Asimismo, también hay evidencia que indica que ciertos miRNAs podrían potenciar la expresión de genes en tipos celulares específicos y en condiciones celulares particulares (44).

Relacionado con esto, se sabe que en la inducción de la expresión génica, por miRNAs, están involucrados complejos proteicos conocidos como “miRNPS” (por sus siglas en inglés microRNA ribonucleoprotein complex), los cuales actúan en trans para promover la expresión de sus mRNAs blanco; este mecanismo es similar al descrito durante la inhibición de la

expresión génica. Si bien no se conoce del todo el mecanismo que rige la potenciación de la expresión, diversas líneas de evidencia sugieren que los miRNPs potencian de forma directa la expresión y/o indirecta al revertir la represión génica mediada por el complejo miRNA • miRNPs (43). De esta manera, un solo miRNA podría dirigir tanto la inducción como la represión génica, lo cual depende de la expresión de ciertos factores proteicos –que conforman lo miRNPs- en condiciones celulares específicas. Efectivamente, se sabe que el miR-145v media la sobre-expresión del gen MYOCD (miocardina) durante la diferenciación del músculo, pero inhibe la expresión de ROCK1 (Proteína Cinasa 1 Asociada a Rho) en el osteosarcoma (45-46). Similarmente, la expresión de KLF4 (Factor 4 (Gut) Similar a Kruppel) es potenciada por el miR-206 –en células en confluencia- y es inhibida por el miR-344 en células en proliferación (47) (Fig. 6). En *D. melanogaster*, se sabe que tanto AGO 1 como AGO2 son capaces de regular la inhibición de la expresión; sin embargo, sólo AGO2 induce la activación de genes cuyos mRNAs carecen de cola de poli(A) (48-49). AGO2, de manera conjunta con el RISC, se une al factor

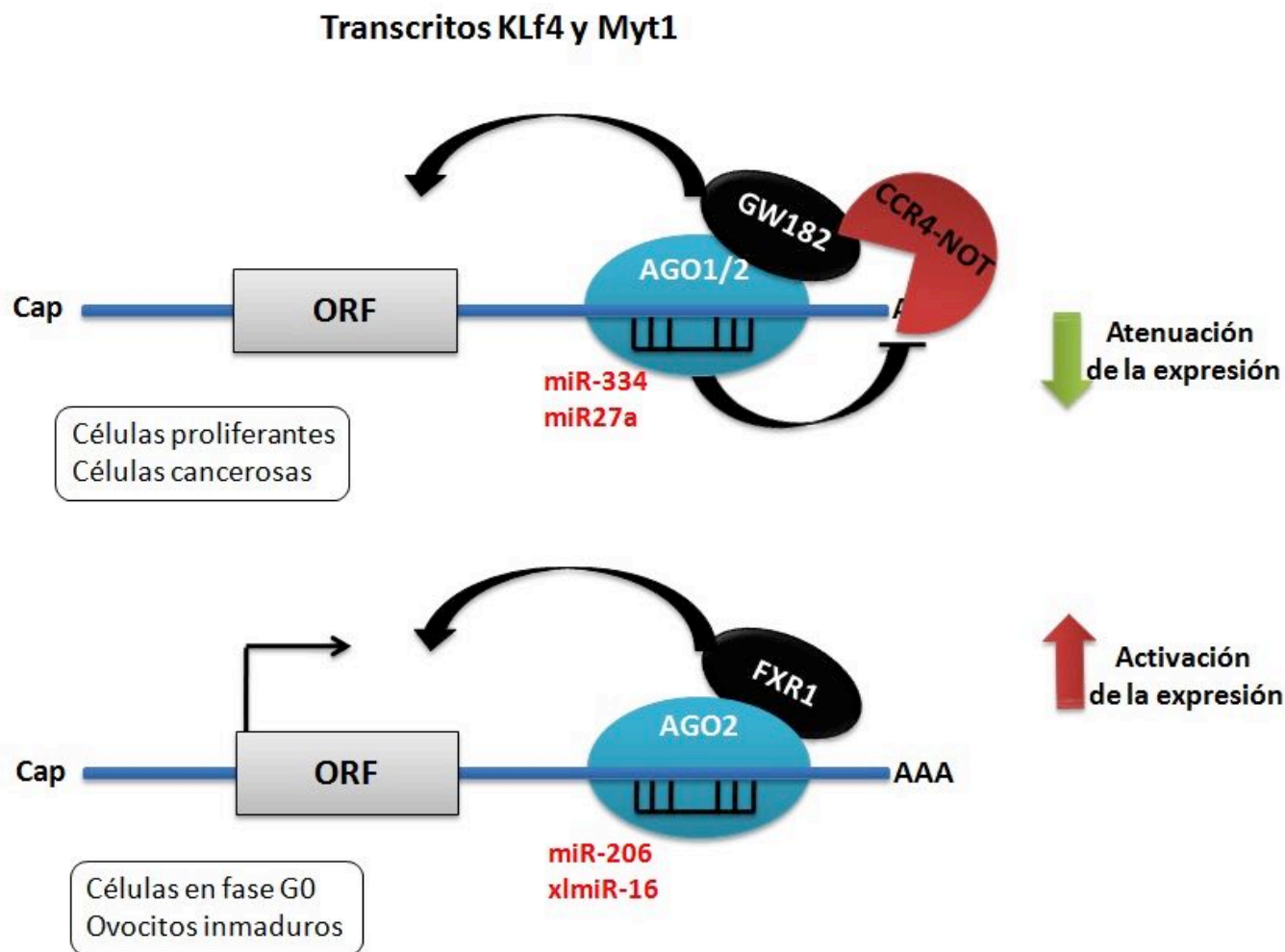


Figura 6. Inhibición y potenciación de la expresión génica mediada por miRNAs. Ciertos miRNAs son capaces de atenuar y activar la expresión génica dependiendo del contexto celular. (Tomado y modificado de la referencia 74).

de inicio de la traducción eIF4E (Factor 4E de Inicio de la Traducción en Eucariotes) e induce una conformación del mRNA de asa cerrada, lo cual induce la activación de la traducción de forma directa (32). Con base en estos resultados, podemos concluir que la inducción de la expresión génica, por miRNAs, depende del tipo celular, así como de las condiciones celulares que rigen su funcionamiento y de los factores proteicos expresados en un momento determinado.

Mecanismos de acción

La identificación de nuevas formas de regulación de la expresión génica por miRNAs hace aun más complejo el estudio y entendimiento biológico de estos RNAs pequeños no codificantes. Como se mencionó antes, diversos estudios indican que la inducción de la expresión de genes, mediada por miRNAs,

es selectiva y depende de la expresión de miRNAs específicos y de componentes como los miRNPs, así como de otras proteínas de unión a RNA (43-50).

Participación del ciclo celular

La inducción de la expresión génica por los miRNPs, depende de los niveles de expresión de distintos factores proteicos que son regulados por las condiciones celulares que rigen la función de la célula en un momento dado. Se sabe que el ciclo celular tiene el potencial de determinar la regulación de la expresión génica, por miRNAs, al promover o inhibir la expresión de mRNAs específicos. Por ejemplo, los niveles proteicos de GW182/TNRC6A (Trinucleotide Repeat Containing 6A) –proteína esencial para la regulación de la inhibición de la traducción– disminuyen en la fase G0 del ciclo celular y en ovocitos maduros, lo cual induce la liberación de Ago y pro-

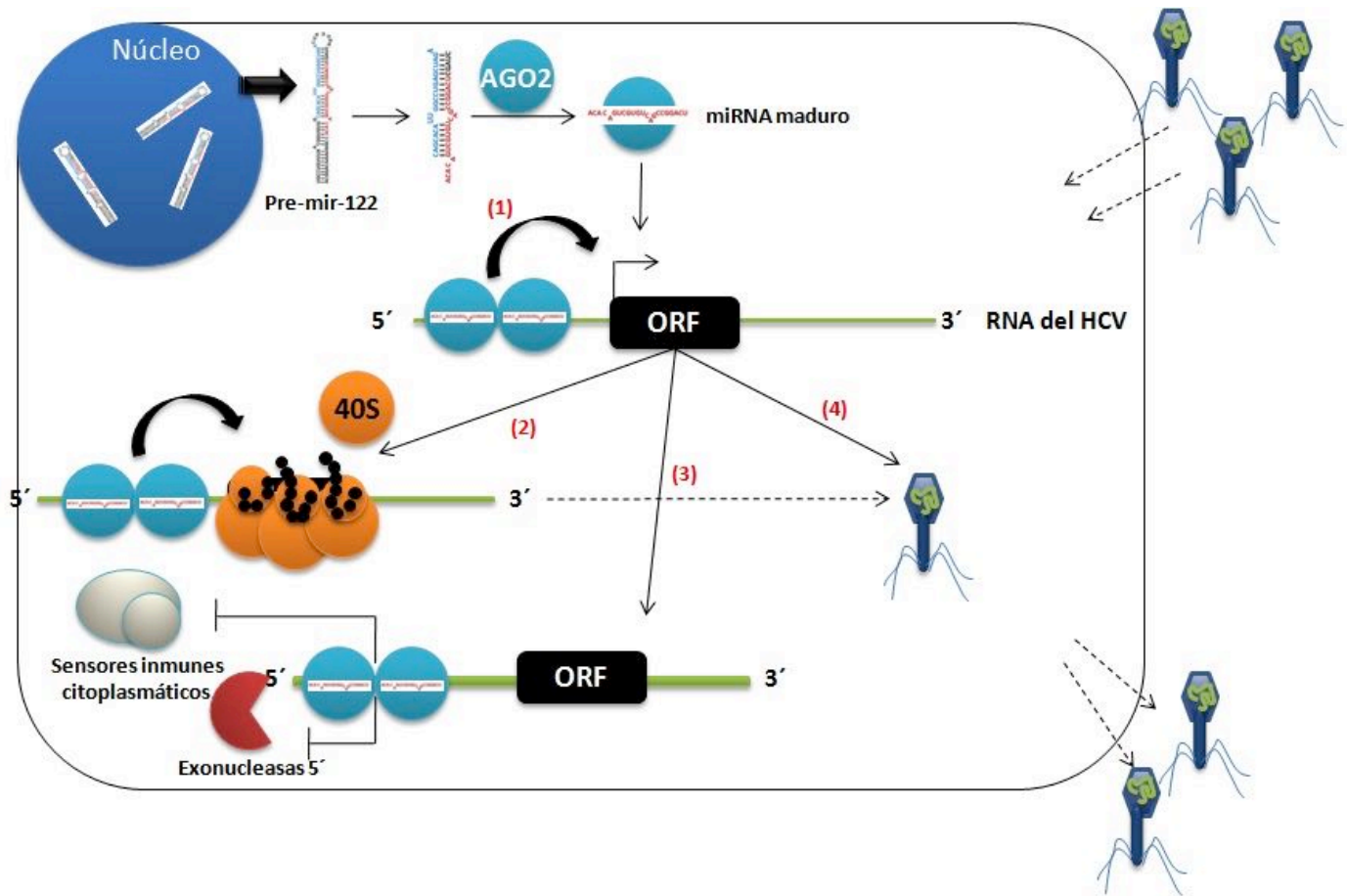


Figura 7. Activación de la expresión del virus de la hepatitis C (HCV) por el miR-122. (1) El miR-122 provee de un andamio para la unión de factores esenciales tales como la RNA polimerasa para la replicación del RNA. (2) Asimismo, los complejos miRNPs incrementan la asociación de la subunidad 40S ribosomal y esto resulta en un incremento en la traducción y en los niveles de proteína. (3) También, los miRNPs forman un complejo inusual en la región 5' terminal del RNA del HCV, el cual incrementa la estabilidad del RNA al proteger a esta región de la acción de exonucleasas 5' y de sensores del sistema inmune. (4) La unión del miR-122 incrementa la propagación y el ciclo de vida del virus por mecanismos desconocidos. (Tomado y modificado de la referencia 74).

mueve su interacción con la proteína FXR1 (Proteína 1 de X frágil) en el complejo miRNP. Esto resulta en la inducción de la expresión génica (Fig. 6) (51). Por lo tanto, la regulación a la baja de los niveles de expresión de GW182/TNRC6A desbloquea la inhibición de la expresión, mientras que la asociación de FXR1 con AGO2 la potencia (52-53). Similarmente, la función canónica de las proteínas Argonauta, asociada con la hidrólisis del mRNA blanco, está ausente en ovocitos maduros y células en fase G0 (54-55), por lo que su función, en estas condiciones celulares, más bien se asocia con la potenciación de la traducción (56-58).

Región 5' UTR del mRNA blanco

El miR-122, el cual se expresa sólo en el hígado, incrementa los niveles del RNA del virus de la hepa-

titis C (HVC) al interaccionar con dos sitios de unión en la región 5' UTR. Con el objetivo de conocer si la localización del sitio de unión del miRNA tiene un efecto sobre los niveles del mRNA, los autores cambiaron el sitio de unión del miR-122 a la región 3' UTR del mRNA y demostraron que la unión del miRNA ahora inhibe la traducción del RNA del HCV (59). Estos resultados indican que la potenciación de la expresión génica depende del sitio de unión del miRNA a su RNA blanco (59-60); no obstante, el mecanismo de acción del miR-122 no se conoce del todo (61). Sólo se sabe que interacciones de la región semilla y de otras regiones de este miRNA son necesarias para incrementar los niveles del RNA viral (62).

Debido a que el genoma del HCV no tiene CAP en su extremo 5' terminal y por lo tanto, carece de proteínas de unión específicas para esta región,

éste requiere de mecanismos alternativos para mantener su estabilidad –evasión de su degradación por exonucleasas- y para reclutar componentes de inicio de la traducción (28). De acuerdo a esto, se propone que el miR-122 protege a este RNA de la degradación por la exonucleasa Xrn1 e incrementa la estabilidad del RNA y acelera su unión al ribosoma; en conjunto, todo esto incrementa la expresión del gen del HCV (63-64). Componentes moleculares como el RISC, que es presentado al genoma del HCV por los miRNPs, podrían proteger las regiones 5' terminales -de RNAs de cadena sencilla- de la acción de las exonucleasas citosólicas (64). La figura 7 muestra los mecanismos por los que el miR-122 induce la expresión del gen HCV (65).

ii) Metilación del DNA por microRNAs

En plantas, la clase más abundante de RNAs pequeños (RNAsp) corresponde a RNAs de interferencia (siRNAs) heterocromáticos, los cuales se transcriben a partir de transposones y de repetidos de DNA. De manera importante, estos siRNAs dirigen la metilación del DNA –en la base citosina- en los *loci* a partir de los cuales fueron producidos; este proceso se denomina metilación del DNA dirigido por RNA (MDdR). La MDdR generalmente resulta en el silenciamiento transcripcional de transposones y ciertos genes que son adyacentes a los repetidos de DNA que originan a estos siRNAs (66-68). Similarmente, en diferentes especies de plantas se sabe que un subtipo de miRNAs –de 24nt- dirige la metilación del DNA (69).

Además de los miRNAs convencionales (~21 nt), en el arroz (*Oryza sativa*) se han identificado docenas de *loci* a partir de los cuales se transcriben miRNAs de 24 nt conocidos como miRNAs largos (miRNAsl). Al igual que los siRNAs mencionados anteriormente, este tipo de miRNAs dirige la metilación y represión de los *loci* que los originan regulación en *cis*, así como de genes blanco localizados en otras regiones genómicas regulación en *trans* (69). Con estos datos se revela que los miRNAs regulan la expresión de genes al modificar la estructura de la cromatina regulación transcripcional en plantas; si esto ocurre en animales tiene que ser demostrado.

iii) Los miRNAs miR-21 y miR-29a son ligandos de los receptores TLR7 y TLR8

Diferentes líneas de evidencia indican que las células son capaces de adaptarse a su microambiente por medio de la secreción de vesículas denominadas exosomas. Los exosomas son vesículas de 50-120 nm de diámetro que contienen proteínas, moléculas presentadoras de antígenos, mRNAs, RNAs no codi-

ficantes y DNA (70-72). Al transportar proteínas y RNAs los exosomas modulan la función de las células receptoras y órganos a distancia. Aun cuando no se conoce bien cómo los exosomas participan en la comunicación célula-célula, varios estudios indican que las interacciones ligando-receptor tienen una función importante en este proceso (73).

A la fecha, existe evidencia suficiente que indica que los miRNAs son liberados hacia el espacio extracelular en exosomas; sin embargo, los mecanismos que rigen la elección de cuáles miRNAs se endocitan en los exosomas, el reconocimiento de los exosomas por la célula receptora y la función de estos miRNAs en su nuevo nicho celular están pobremente descritos. De manera general, se sabe que los miRNAs exógenos regulan la expresión de la célula receptora por la vía canónica que involucra la unión a su mRNA blanco; sin embargo, Fabbri y cols. (9) demostraron que los miRs 21 y 29a funcionan por un mecanismo distinto. Estudios de inmunoprecipitación demostraron la interacción de estos miRNAs con los receptores TLR7 y TLR8 en células del sistema inmune. Interesantemente, la unión de los miRs 21 y 29a a estos receptores disparó la respuesta inflamatoria prometastática, lo cual tuvo como resultado la inducción del crecimiento tumoral y de la metástasis. De esta manera, es el primer indicio de que los miRNAs funcionan como agonistas paracrinos de los TLRs para regular el microambiente tumoral (Fig. 8).

COMENTARIOS FINALES

El estudio de los miRNAs ha permitido identificar diversos mecanismos por los que la célula controla la expresión génica en condiciones específicas. Evidencia inicial indicaba que la biogénesis y los modos de acción de los miRNAs eran muy conservados y poco flexibles; sin embargo, ahora se conocen al menos cuatro vías biogénicas y múltiples modos de acción de estos pRNAs. Por lo que, la regulación de la expresión génica- por miRNAs- parece ser sumamente compleja y resalta el cuidado que debemos de tener en la interpretación de los resultados obtenidos durante su estudio. Como si no fuera suficiente, los miRNAs también forman parte de la comunicación paracrina al ser secretados, en exosomas, hacia el espacio extracelular. El mecanismo por el que estos miRNAs circulantes ejercen su efecto involucra el reconocimiento del mRNA blanco y su interacción directa con los receptores TLR 7 y TLR8.

CONCLUSIONES

Los miRNAs son reguladores de la expresión génica altamente complejos en cuanto a los mecanismos

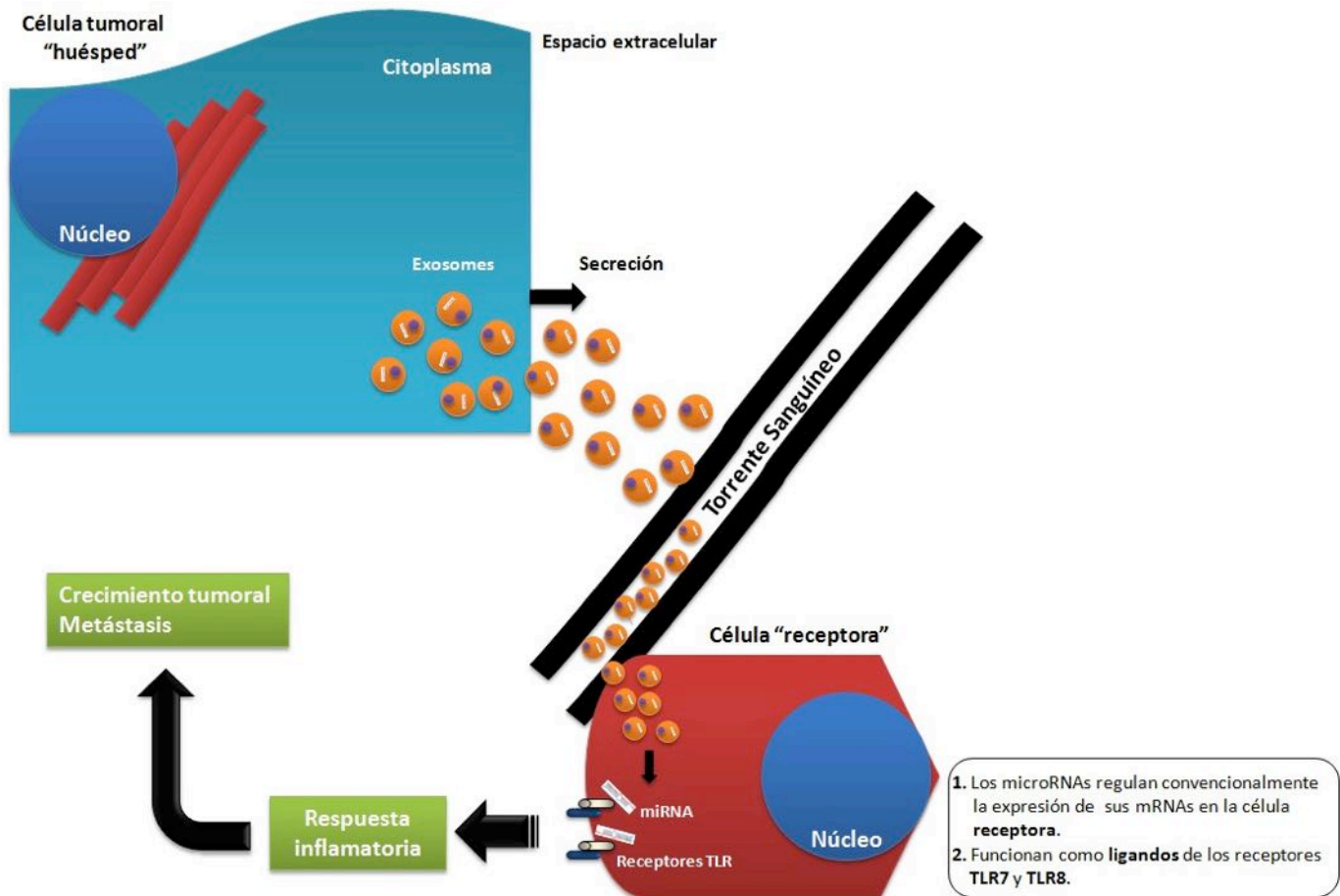


Figura 8. Los microRNAs funcionan como ligandos de los receptores TLR7 y TLR8. Fabbri y cols. demostraron que los miRNAs circulantes miR-21 y miR-29a inducen la respuesta inflamatoria de manera dependiente de la activación de los receptores TLR7 (en el ratón) y TLR8 (en el humano). Esto tiene como resultado la inducción del crecimiento tumoral y de la metástasis.

de biosíntesis y de acción que los rigen. Estos pRNAs pueden atenuar e inducir la expresión génica a diferentes niveles de regulación y su secreción permite la adaptación del sistema a condiciones específicas, y sugiere innumerables mecanismos de acción en la célula receptora.

GLOSARIO

RNAs pequeños no codificantes. RNAs con un tamaño menor que 200 pares de bases (pb).

RNAs largos no codificantes. RNAs con un tamaño mayor que 200 pb.

Transposón. Secuencia de DNA que puede moverse a diferentes partes del genoma.

Pseudogenes. Genes que han perdido su función. Algunos de ellos codifican para proteínas truncas o no funcionales.

Secuencia Alu. Elementos móviles más abundantes del genoma humano. Están altamente conservados en los primates.

Ribonucleasa de tipo III. Enzima que cataliza la hidrólisis de RNA de doble cadena.

Drosha. Ribonucleasa de tipo III.

Dicer. Ribonucleasa de tipo III.

Endonucleasa. Enzima que cataliza la ruptura de enlaces fosfodiéster dentro de una cadena polinucleotídica.

Exonucleasa. Enzima que cataliza la ruptura de enlaces fosfodiéster en los extremos 5' ó 3' de una cadena polinucleotídica.

Exportinas. Grupo de proteínas involucradas en el transporte de RNA y/o proteínas del núcleo hacia el citoplasma; es un proceso dependiente de energía.

Argonauta. Familia de proteínas que tienen una función central en el silenciamiento del ácido ribonucleico (RNA); son componentes esenciales del sitio catalítico del Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC).

RISC. Complejo ribonucleoproteico formado por proteínas (Argonauta) y RNA que participa en el silenciamiento de genes.

Splicing o empalme alternativo. Edición del pre-mRNA naciente. Este proceso involucra la eliminación de los intrones y la unión de los exones.

Esplíceosoma. Complejo molecular constituido por RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y proteínas que está encargado del "splicing".

Cola de poli-A. Cadena de adeninas (100-250 residuos) presentes en el extremo 3' de los mRNAs; su presencia impide la degradación del mRNA.

Cap. Unión del 7-metilguanilato a la región 5' terminal de los mRNAs. Es importante para la maduración y estabilidad del mRNA durante la traducción.

Exosomas. Vesículas secretadas por la célula hacia el espacio extracelular; su diámetro es de ~50-120 nm.

Agonista. Molécula que se une y activa a un receptor para producir la respuesta una respuesta biológica.

Antagonista. Molécula que bloquea la acción del agonista. 

REFERENCIAS

- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huseon DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratt E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glades A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Hall LL, Lawrence JB (2016) RNA as a fundamental component of interphase chromosomes: could repeats prove key? *Curr Opin Genet Dev* 37: 137-147.
- de Andres-Pablo A, Morillon A, Wery M (2016) LncRNAs, lost in translation or licence to regulate? *Curr Genet* [Epub ahead of print]
- Zou Y, Liu W, Zhang J, Xiang D (2016) miR-153 regulates apoptosis and autophagy of cardiomyocytes by targeting Mcl-1. *Mol Med Rep* doi: 10.3892/mmr.2016.5309. [Epub ahead of print]

6. Zaho L, Kunst L (2016) SUPERKILLER complex components are required for the RNA exosome-mediated control of cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant Physiol* pii: pp.00450.2016. [Epub ahead of print]
7. Wen J, Ladewig E, Shenker S, Mohammed J, Lai EC (2015) Analysis of Nearly One Thousand Mammalian Mirtrons Reveals Novel Features of Dicer Substrates. *PLoS Comput Biol* 11: e1004441.
8. Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML (2012) Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res* 40: 4626-4640.
9. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, Zanesi N, Crawford M, Ozer GH, Wernicke D, Alder H, Caligiuri MA, Nana-Sinkam P, Perrotti D, Croce CM (2012) MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2110-6.
10. Mah SM, Buske C, Humphries RK, Kuchenbauer F (2010) miRNA*: a passenger stranded in RNA-induced silencing complex? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20: 141-8.
11. Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, de la Chapelle A (2009) Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1502-1505.
12. Lewis BP, Burge BC, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20.
13. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957-1966.
14. Smalheiser NR, Torvik VI (2005) Mammalian microRNAs derived from genomic repeats. *Trends Genet* 21: 322-326.
15. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 13: 1097-1101.
16. Chung Wj, Agius P, Westholm JO, Chen M, Okamura K, Robine N, Leslie CS, Lai EC (2011) Computational and experimental identification of mirtrons in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* 21: 286-300.
17. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J (2009) A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, proteomics & Bioinformatics* 7: 147-154.
18. Steitz A, Vasudevan S (2009) miRNPs: versatile regulators of gene expression in vertebrate cells. *Biochem Society Transactions* 37: 931-935.
19. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20.
20. Lee I, Ajay SS, Book KL, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM, Athey BD (2009) New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* 19: 1175-1183.
21. Brummer A, Hausser J (2014) MicroRNA binding sites in the coding region of mRNA: extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *BioEssays* 36: 617-626.
22. Brodersen P, Voinnet O (2009) Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 141-148.
23. Majoros WH, Ohler U (2007) Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions. *BMC Genomics* 8: article 152.
24. Ohler U, Yekta S, Lim LP, Bartel DP, Burge CB (2004) Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *RNA* 10: 1309-1322.
25. Grewal SIS, Elgin SCR (2007) Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447: 399-406.
26. Finnegan EJ, Matzke MA (2003) The small world. *Journal of Cell Science* 116: 4689-4693.
27. Fabian ME, Sonenberg N, Filipowicz (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry* 79: 351-379.
28. Garneau NL, Wilus CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 113-126.
29. Valencia-Sánchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes and Development* 20: 515-524.
30. Bagga S, Bracht J, Hunter J, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122: 553-563.
31. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai et al. RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317: 1764-1767.

32. Iwasaki S, Tomari Y (2009) Argonaute-mediated translational repression (and activation). *Fly* 3: 204-206.
33. Wang B, Yane, A Novina CD (2008) MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5343-5348.
34. Lytle JR, Yario TA, Steits JA (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 9667-9672.
35. Eulalio A, Huntinger E, Izaurralde E (2008) Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132: 9-14.
36. Ding XC, Grosshans H (2009) Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J* 28: 213-222.
37. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447: 823-828.
38. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317: 1764-1767.
39. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2007) Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17: 118-126.
40. Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Luhrmann R (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* 11: 717-727.
41. Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7: 633-636.
42. Eystathiou T, Jakymiw A, Chan EK, Séraphin B, Cougot N, Fritzler MJ (2003) The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* 9: 1171-1173.
43. Vasudevan S and Steitz JA (2007) "AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2". *Cell* 128: 1105-1118.
44. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008) MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1608-1613.
45. Li E, Zahng J, Yuan T, Ma B (2014) miR-145 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting ROCK1. *Tumour Biol* 35: 7645-7650.
46. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D (2009) miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 460: 705-710.
47. Lin CC, Liu LZ, Addison JB, Wonderlin WF, Ivanov AV, Ruppert JM (2011) A KLF4-miRNA-206 autoregulatory feedback loop can promote or inhibit protein translation depending upon cell context. *Mol Cell Biol* 31: 2513-2527.
48. Turchinovich A, Burwinkel B (2012) Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol* 9: 1066-1075.
49. Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 10: 1518-1525.
50. Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. (2006) Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17337-17342.
51. Yang Z, Jakymiw A, Wood MR, Eystathiou T, Rubin RL, Fritzler MJ, Chan EK (2004) GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J Cell Sci* 117: 5567-5578.
52. Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2007) Argonautes and company: sailing against the wind. *Cell* 128: 1027-1028.
53. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931-1934.
54. Truesdell SS, Mortensen RD, Seo M, Schroeder JC, Lee JH, LeTouqueze O, Vasudevan S (2012) MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP. *Sci Rep* 2: 842.
55. Lund E, Sheets MD, Imboeden SB, Dahlberg JE (2011) Limiting Ago protein restricts RNAi and microRNA biogenesis during early development in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 25: 1121-1131.
56. Mortensen RD, Serra M, Steitz JA, Vasudevan S (2011) Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes

- by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 8281-8286.
57. Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL, Gorospe M. (2009) HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev* 23: 1743-1748.
 58. Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, Safe S (2007) The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 67: 11001-11011.
 59. Jopling CL, Schütz S, Sarnow (2008) Position-dependent function of a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host and Microbe* 4: 77-85.
 60. Niepmann M (2009) Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA. *Cell Cycle* 8: 1473-1477.
 61. Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO Journal* 27: 3300-3310.
 62. Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM (2011) Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *PNAS* 108: 3193-3198.
 63. Li Y, Masaki T, Yamane D, McGivern DR, Lemon M (2013) Competing and non-competing activities of miR-122 and the 5' exonuclease Xrn1 in regulation of hepatitis C virus replication. *PNAS* 110: 1881-1886.
 64. Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, Lemon SM (2012) Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 941-946.
 65. Tsai NP, Lin YL, Wei LN (2009) MicroRNA mir-346 targets the 5' untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem J* 424: 411-418.
 66. Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet* 6: 351-360.
 67. Matzke M, Kanno T, Salinger L, Huettel B, Matzke AJ (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* 21: 367-376.
 68. Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567-576.
 69. Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, Qi Y (2010) DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol Cell* 38: 465-475.
 70. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J (2011) Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2: 180.
 71. Al-Nedawi Km Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10: 619-624.
 72. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol* 9: 654-659.
 73. Yamaguchi T, Izumi Y, Nakamura Y, Yamazaki T, Shiota M, Sano S, Tanaka M, Osada-Oka M, Shimada K, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H (2015) Repeated remote ischemic conditioning attenuates left ventricular remodeling via exosome-mediated intercellular communication on chronic heart failure after myocardial infarction. *Int J Cardiol* 178: 239-246.
 74. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M (2014) Mechanisms of miRNA Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics* 2014: 970607.

LA PARADOJA DEL USO DE ANTIOXIDANTES DURANTE EL TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER: ¿PROTEGER AL ORGANISMO DE LOS EFECTOS TÓXICOS DE LOS ANTINEOPLÁSICOS DISMINUIRÍA LA EFICACIA FARMACOLÓGICA PARA EVITAR EL DESARROLLO DEL CÁNCER?*

Laura Guerrero Medrano¹, María Maldonado Vega² y José Víctor Calderón Salinas¹ [¶]

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Zacatenco. Av. IPN 2508 Col. Zacatenco, Ciudad de México 07360 México. ²Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío, Dirección de Planeación, Enseñanza e Investigación. León, Gto. [¶]Autor de correspondencia correo E: jcalder@cinvestav.mx.

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que consiste en la transformación de células normales a células neoplásicas las cuales se caracterizan por el incremento y pérdida de control de la división celular. Los antineoplásicos son fármacos utilizados en el tratamiento de cáncer, su efecto farmacológico consiste en inducir la apoptosis en las células neoplásicas; sin embargo no son específicos para células neoplásicas y causan efectos tóxicos en células no neoplásicas. Se ha sugerido que el daño oxidativo que causan los antineoplásicos es parte de su toxicidad y que el uso de antioxidantes puede reducir ese daño. El uso de antioxidante podría disminuir el efecto del antineoplásico en el tratamiento del cáncer debido a que el estrés oxidativo puede participar en los mecanismos de acción de estos fármacos. En esta revisión se discuten a) Los mecanismos de acción de los antineoplásicos, b) La participación del estrés oxidativo en la apoptosis inducida por estos fármacos, c) El daño oxidativo generado por el tratamiento con antineoplásicos y d) El co-tratamiento con antioxidantes para reducir el daño oxidativo sin disminuir la eficacia del tratamiento antineoplásico.

ABSTRACT

Cancer is a disease that involves the transformation of normal cells to neoplastic cells. The hallmarks of neoplastic cells are rapid cell proliferation and uncontrolled cell growth. Antineoplastic drugs used in cancer treatment induce apoptosis in neoplastic cells; however they are not specific for neoplastic cells and cause toxic effects in non-neoplastic cells. Oxidative damage maybe induced by antineoplastic treatment, this damage could be involved in the toxicity of treatment, so antioxidants use have been proposed to reduce this toxicity. However antioxidant could decrease pharmacological effect of the antineoplastic because oxidative stress might participate in the mechanisms of action of antineoplastic. In this review we discute about a) antineoplastic action mechanisms, b) involvement of oxidative stress in apoptosis induced by treatment, c) oxidative damage generated by antineoplastic treatment, and d) antioxidants co-treatment to reduce oxidative damage without inhibit antineoplastic-induced apoptosis.

PALABRAS

CLAVE:

Cáncer, quimioterapia, daño oxidativo, efectos tóxicos, respuesta antioxidante.

KEY WORDS:

Cancer, chemotherapy, oxidative stress, toxicological effects, antioxidant response.

El cáncer y la neoplasia son dos términos que cotidianamente suele utilizarse como sinónimos; no obstante no significan lo mismo. El cáncer es la enfermedad, la neoplasia son células resultantes de las mutaciones de una célula normal a una célula transformada, ésta última caracterizada por el incremento y pérdida del control de la división celular, la pérdida de la comunicación con otras células y de la estructura tisular (1, 2).

El cáncer como enfermedad se manifiesta cuando el crecimiento acelerado y sin control de un grupo de células neoplásicas de un tejido afecta las funciones metabólicas y fisiológicas del tejido y del organismo. La transformación de células normales a células neoplásicas es un proceso gradual de mutaciones acumuladas, iniciando por mutaciones activadoras de los protooncogenes e inhibidoras de los genes supresores de tumor (3).

Las células neoplásicas en cuanto forman una masa crítica dan origen al tumor canceroso y con ello a la enfermedad del cáncer. A pesar de que se han identificado más de 100 tipos distintos de cáncer y sus diversos subtipos, todos los tumores cancerosos comparten ocho características distintivas: a) Señales de proliferación celular en funcionamiento permanente; b) Reducción de las señales de inhibición de crecimiento celular; c) Activación de procesos de invasión y metástasis; d) Desarrollo de inmortalidad celular; e) Inducción de angiogénesis; f) Resistencia a la muerte celular; g) Reprogramación del metabolismo energético y; h) Evasión del ataque por el sistema inmune (4).

El conocimiento de las características de las células neoplásicas y del desarrollo del cáncer se ha usado en el diseño de una amplia gama de opciones terapéuticas. Una forma de tratamiento es la remoción del tumor, sin embargo no en todos los casos es efectiva porque las células neoplásicas tienen la capacidad de migrar y generar nuevos centros tumorales. Otra alternativa es el uso de radiación para disminuir el tamaño de los tumores cancerosos y mantener en remisión a los pacientes con cáncer, una tercera forma es el uso de fármacos con propiedades antineoplásicas. De esta manera la cirugía, la radioterapia y el uso de fármacos antineoplásicos, también conocidos como quimioterapia, se convirtieron en los tratamientos estándar para combatir al cáncer. El aumento en el conocimiento de las características de las células neoplásicas permitió el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas tales como: inmunoterapia, hormonoterapia, inhibidores de vías de señalización, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de los receptores de factores de crecimiento y la terapia génica (2).

Los tratamientos que combinan varias opciones

terapéuticas han contribuido a mejorar el pronóstico en el desarrollo de la enfermedad y las posibilidades de sobrevivencia. Los antineoplásicos se utilizan con mucha frecuencia por su efectividad y amplio espectro terapéutico; su efecto se incrementa al combinarlos con otras opciones como la radioterapia, la hormonoterapia, etc. Es por estas razones que, no obstante, los numerosos y graves efectos tóxicos sobre las células no neoplásicas y en el organismo, se siguen utilizando (2, 5).

Efectos farmacológicos y toxicológicos del tratamiento con antineoplásicos

Los antineoplásicos son un grupo de moléculas con una gran diversidad en su estructura química y mecanismo de acción, cuya característica en común es inducir la muerte celular por apoptosis de las células neoplásicas.

El efecto farmacológico se define como la manifestación benéfica para el organismo producida por el fármaco, en el caso de los antineoplásicos es la eliminación o el control de la proliferación de las células neoplásicas en el organismo (6). Para lograr el efecto farmacológico, los antineoplásicos pueden utilizarse en diversas modalidades durante el tratamiento contra el cáncer: a) Tratamiento de inducción, cuando se utilizan como la primera o la única terapia, también conocida como terapia de primera línea o tratamiento primario; b) Tratamiento adyuvante, cuando se emplean como terapia de refuerzo después del tratamiento primario con cirugía o radioterapia; c) Terapia neoadyuvante, cuando se administra antes de otro tipo de tratamiento: cirugía, radioterapia, inmunoterapia; para disminuir el tamaño del tumor (3, 6).

El efecto toxicológico de un fármaco es la generación de daño a células y tejidos que provoca alteraciones patológicas. En el caso de los antineoplásicos, se refiere al daño local o sistémico por dañar a células no afectadas por el cáncer, se conoce como *efecto secundario* o *efecto colateral* del tratamiento. La intensidad y especificidad del efecto dependen del tipo de antineoplásico, la dosis, el tiempo de exposición, el tipo celular y las condiciones metabólicas y fisiológicas particulares de cada individuo (5).

Algunos de los efectos toxicológicos más frecuentes de los antineoplásicos son hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, cardiopatías e infertilidad. Sus manifestaciones clínicas iniciales van desde náuseas, vómito, pérdida de peso, inflamación de las mucosas (mucositis) y alopecia hasta leucopenia, anemia y desórdenes cognitivos (7).

La toxicidad de los antineoplásicos es un factor

que obliga a modificar la dosis o el tiempo de tratamiento; la reducción de cualquiera de estos dos factores disminuye las posibilidades de controlar el cáncer (2, 7).

Por otra parte, las células neoplásicas pueden tener una respuesta adaptativa al tratamiento con el antineoplásico, que provoca resistencia al fármaco debido a la generación de nuevas mutaciones adaptativas o por selección de clones resistentes que favorecen el desarrollo del tumor (3, 8).

Tipos de antineoplásicos

Existen diferentes formas de clasificar a los antineoplásicos, la más utilizada es según su mecanismo de acción. De acuerdo con este criterio (2, 5) los antineoplásicos se clasifican en:

- a) **Agentes alquilantes.**- Moléculas que contienen en su estructura un grupo alquilo que ataca al átomo de nitrógeno en la posición N-7 de la guanina del DNA o que pueden formar puentes intercatenarios, estos últimos se denominan alquilantes bifuncionales, de manera que los aductos formados por esta reacción impiden la replicación. Dentro de este grupo se encuentran: la ciclofosfamida, la ifosfamida, la mitomicina C, la carmustina, el busulfan y la temozolomida, entre otros.
- b) **Análogos de platino.**- Moléculas basadas en platino y cloro o platino y amonio, que forman entrecruzamientos con el DNA de manera similar a los agentes alquilantes bifuncionales, impidiendo la replicación. El cisplatino, el carboplatino y el oxaliplatino son los principales representantes de este grupo.
- c) **Antimetabolitos.**- Moléculas análogas a las esenciales para la síntesis de DNA y con ello para la replicación, tienen mayor actividad durante la fase S del ciclo celular. Estos compuestos pueden inhibir directamente o indirectamente la síntesis de purinas o pirimidinas. Pertenecen a este grupo el metotrexato, la mercaptopurina y el fluorouracilo.
- d) **Inhibidores de topoisomerasa.**- Inhiben la actividad de la topoisomerasa I y II y producen fragmentación de las cadenas de DNA y falla en la replicación, actúan principalmente en células en fase S. El irinotecan y el topotecan son ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa I; los inhibidores de la topoisomerasa II incluyen a la doxorubicina, la daunorubicina, la mitoxantrona y la amsacrina.
- e) **Antibióticos citotóxicos.**- Moléculas inicialmente aisladas a partir de actinomicetos con propiedades antibacterianas y antineoplásicas.

Algunas de éstas presentan mecanismos propios de otros grupos: las antraciclinas son inhibidores de la topoisomerasa II, la pentostatina actúa como antimetabolito y la mitomicina tiene actividad alquilante, la dactinomicina forma aductos con el DNA y provoca daño por radicales libres, la bleomicina provoca fragmentación al DNA mediante daño oxidativo.

- f) **Antimicrotúbulos.**- Moléculas aisladas inicialmente de la planta *Vinca rosea* que interactúan con la tubulina para evitar la formación o la despolimerización del huso mitótico; en ambos casos no es posible entrar en la metafase y la célula muere por apoptosis. Su mayor actividad se presenta durante la fase M del ciclo celular. Los alcaloides vinca, tales como la vinblastina y la vinorelbina, inhiben el ensamblaje de los microtúbulos; en tanto que los taxanos, como el paclitaxol y el docetaxol, evitan su despolimerización.

La apoptosis como efecto farmacológico de los antineoplásicos

A pesar de que los fármacos antineoplásicos se empezaron a utilizar hace más de cincuenta años, los mecanismos de acción y las vías metabólicas involucradas no han sido completamente dilucidadas. Tampoco se han identificado los mecanismos de interacción entre la célula neoplásica y los agentes antineoplásicos debido a que los tumores cancerosos están formados por subclonas de células neoplásicas que cambian a medida que evoluciona la enfermedad (1, 2).

La quimiosensibilidad y la quimiorresistencia son respuestas adaptativas de la célula neoplásica al antineoplásico. Ambas dependen de las características fenotípicas y genotípicas particulares de cada subclona celular y de la influencia del microambiente tumoral. Para el organismo es crítico mantener un balance entre la velocidad de la proliferación y de la muerte celular. Cuando el equilibrio se desplaza hacia la proliferación de las células neoplásicas, el tumor canceroso no solo aumenta de tamaño, también se incrementa su potencial invasivo y se pueden producir células metastásicas (1, 2, 9).

Las investigaciones sobre la apoptosis inducida por antineoplásicos se han enfocado en la participación de las moléculas involucradas en el inicio de la apoptosis pero aún falta dilucidar las moléculas y vías involucradas en el proceso apoptótico. Para lograr el efecto farmacológico el antineoplásico induce, directa o indirectamente, una serie de respuestas celulares basadas en la modulación de citocinas, hormonas, factores de crecimiento y vías

de señalización que desembocan en la activación intrínseca o extrínseca de la apoptosis de la célula neoplásica (2).

En el caso de la respuesta adaptativa de las células neoplásicas, el fármaco o sus metabolitos dañan al DNA, bloquean los sistemas de reparación celular e inhiben la apoptosis, de manera que las células neoplásicas podrían dividirse a pesar del material genético dañado y contribuir a la generación de nuevas clonas portadoras de mutaciones asociadas con la quimiorresistencia. El daño al DNA también podría afectar a las células no neoplásicas y provocar mutaciones que en algún momento darían origen a poblaciones de células neoplásicas derivadas del efecto del tratamiento antineoplásico; tanto en células neoplásicas como en no neoplásicas el antineoplásico podría dañar la síntesis de proteínas, las membranas citoplasmática y mitocondrial, alterar el equilibrio oxidativo y el potencial energético de las células, en conjunto estas alteraciones podrían contribuir a la evasión de la apoptosis (2, 8, 9).

La apoptosis inducida por los antineoplásicos en las células neoplásicas es, en términos generales, similar al proceso apoptótico inducido por otros agentes o condiciones en células no neoplásicas: a) Mediante la vía intrínseca, el estímulo que induce la apoptosis actúa directamente en la célula que desencadena una serie de reacciones que inician con la activación de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak, la inhibición de las antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL y la liberación del citocromo C; posteriormente a ello se forma el apoptosoma y se inicia la cascada de activación de caspasas, iniciando por la caspasa-9 la cual activa a las caspasas efectoras -3 y -7; b) Por la vía extrínseca, caracterizada por la secreción de mediadores como Fas o TNF- α por células cercanas a la célula que entrará en apoptosis. Después de su liberación Fas o TNF- α se unen a los receptores de muerte (DR) principalmente los DR4 y DR5 y se recluta a la caspasa-8 como caspasa iniciadora. La activación de la caspasa-8; activa a la caspasa-3 para iniciar la apoptosis del tipo I (independiente de la mitocondria) o bien, la caspasa-8 corta a la proteína Bid para después liberar al citocromo C y activar la apoptosis tipo II (dependiente de la mitocondria) (2, 9, 10).

A partir de estudios en células resistentes a los antineoplásicos se ha podido comprobar que además de las moléculas antes mencionadas la vía PI3K/Akt tiene un importante papel para determinar la inducción o la inhibición de la apoptosis. También influyen las proteínas de choque térmico Hsp; la survivina, una proteína que participa en la formación del cinetocoro y que es supresora de la

apoptosis, las proteasas de la familia de las calpaínas y el factor de necrosis NF- κ B (9, 11, 12).

Es evidente que dada la gama de antineoplásicos no es posible establecer un modelo único que explique la apoptosis inducida por estos fármacos. Los efectos de los antineoplásicos sobre los fenómenos apoptóticos también son variados, dependientes de dosis y de respuestas celulares complejas, así como una serie de factores específicos para célula, órgano, tejidos, organismo y especie. Por lo tanto, la caracterización del proceso apoptótico es tarea compleja y hasta el momento la investigación se ha enfocado al estudio de la apoptosis inducida por unos cuantos fármacos, los de uso más frecuente. La información disponible debe analizarse en su contexto.

a) Antineoplásicos que inducen la apoptosis por la vía intrínseca: Ciclofosfamida, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, aclarubicina, doxorubicina y mitoxantrona

Apoptosis inducida por agentes alquilantes o por los análogos del platino

El antineoplásico alquilante ciclofosfamida (CTX) y los análogos de platino: cisplatino (CPT), carboplatino y oxaliplatino forman aductos con el DNA (Fig. 1.a) y al hacerlo detienen la maquinaria de replicación. En respuesta al daño al DNA la célula incrementa la síntesis de la enzima poli-ADP-ribosa (PARP-1) dependiente de NAD⁺ (Fig. 1.a) como un mecanismo de reparación del daño; si el daño no puede ser reparado o la célula no cuenta con suficiente NAD⁺ y ATP estas moléculas se agotan rápidamente (Fig. 1.b), y le sigue la activación de calpaínas (Fig. 1.c). Estas proteínas cortan a Bid (Fig. 1.d) y lo transforman en tBid (Fig. 1.e), el cual se moviliza del citosol a la mitocondria (Fig. 1.f) y contribuye a la activación de Bax (Fig. 1.g); posteriormente Bax aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial y favorece la liberación del Factor Inductor de Apoptosis (AIF) desde la mitocondria hacia el citosol y el núcleo (Fig. 1.h). En el núcleo AIF se asocia con las proteínas ciclofilina A (Cyp A) y H2AX (Fig. 1.i) para formar el complejo de degradación del DNA (13, 14, 15).

La expresión de PARP-1 tiene como objetivo la reparación del daño al DNA y la sobrevivencia celular; sin embargo cuando el daño no puede ser reparado la célula induce la muerte celular por apoptosis mediante el mecanismo antes descrito; la disminución de la concentración de NAD⁺ y ATP, antes de iniciar la apoptosis induce la muerte por necrosis. Existe evidencia de que la apoptosis no es la única forma de muerte celular inducida por

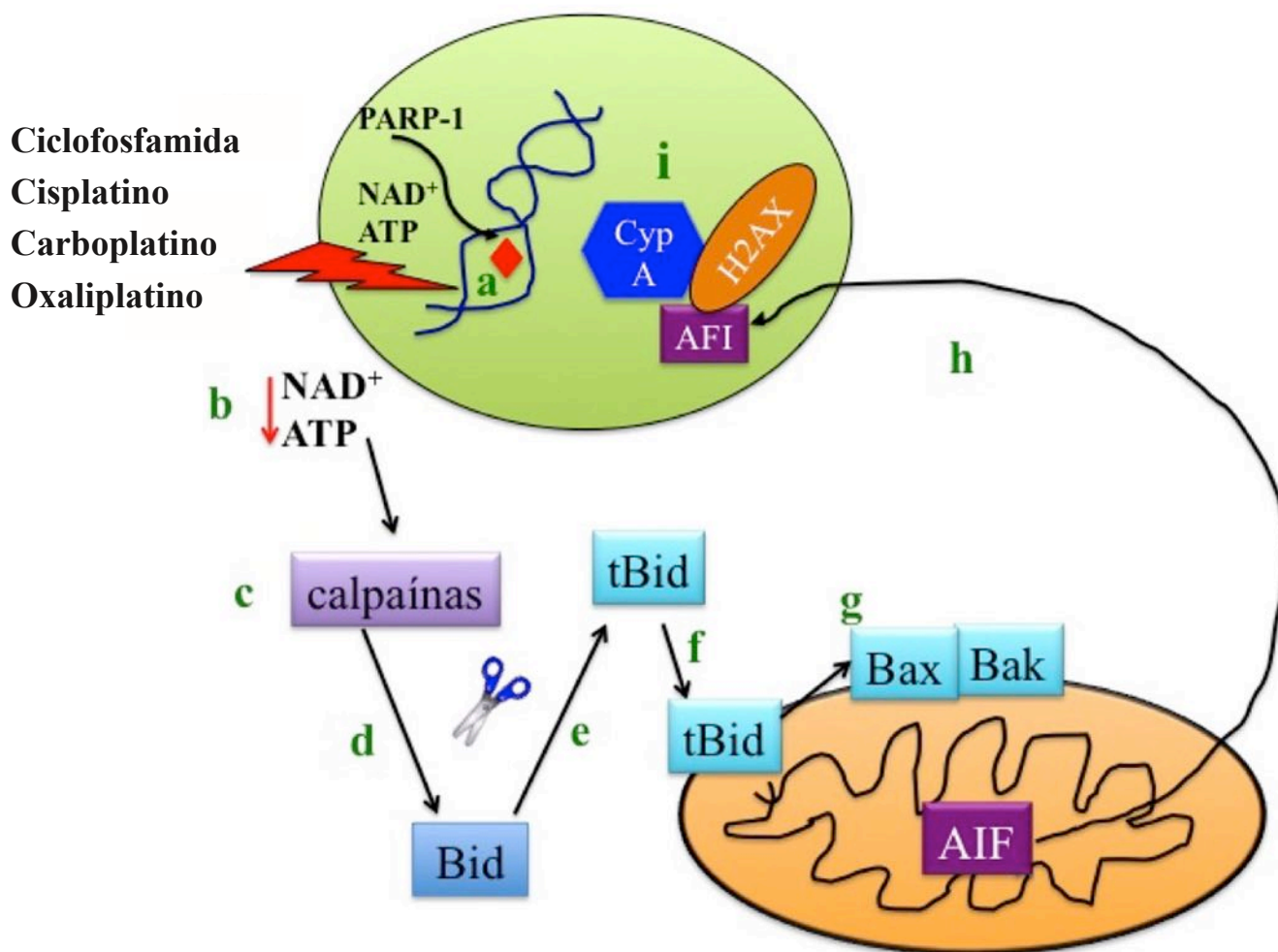


Figura 1. Mecanismo de apoptosis inducida por agentes alquilantes y análogos de platino. Las reacciones que culminan con la apoptosis inducida por la ciclofosfamida, el cisplatino, el carboplatino y el oxaliplatino inician con la expresión de PARP-1 después del daño al DNA generado por estos antineoplásicos. Abreviaturas: PARP-1, enzima poli-ADP-ribosa dependiente NAD⁺; AIF, Factor Inductor de Apoptosis; CypA, ciclofilina A.

los metabolitos de estos antineoplásicos; las condiciones celulares podrían incluir la participación de otras moléculas y conducir a otro tipo de muerte celular. Por ejemplo, en células SGC-7901 de cáncer gástrico incubadas con oxaliplatino, durante las primeras 32 h la muerte celular fue por apoptosis de acuerdo al mecanismo antes descrito. Después de 32 h la presencia de lactato deshidrogenasa y de Cyp A en el medio es un indicador del rompimiento de la integridad de la membrana plasmática; lo que coincidió con el incremento en la expresión de Bmf, una proteína inhibidora de la apoptosis. La máxima actividad de PARP-1 y de las caspasas -9 y -3 ocurrió a las 24 h, después de este tiempo las caspasas se encontraron como procaspasas y disminuyó la concentración de PARP1; los anteriores datos junto con los resultados de los ensayos con anexina V, las observaciones al microscopio

electrónico y los ensayos con z-VAD, un inhibidor de caspasas, y con Nec-1, un inhibidor de necrosis, permiten concluir que el oxaliplatino induce la muerte tanto por apoptosis como por necrosis como resultado del cambio de condiciones en el ambiente celular debido al proceso apoptótico y que la necrosis es una vía alterna en células resistentes a la apoptosis (14, 15).

Apoptosis inducida por antraciclinas

Las antraciclinas inhiben la actividad de las topoisomerasas I o II y provocan el rompimiento de una o ambas cadenas del DNA. Este daño al DNA induce la apoptosis por la vía intrínseca con o sin la participación de las caspasas. Un mismo antineoplásico puede inducir la apoptosis por la vía intrínseca por mecanismos que difieren en la identidad de

Tabla 1
Comparación de los eventos proapoptóticos inducidos por doxorubicina en dos líneas celulares.
Los eventos proapoptóticos ocurren en diferentes tiempos dependiendo del tipo celular. Las proteínas proapoptóticas de la familia BH3, NOXA y PUMA, tienen un importante papel en la apoptosis independiente de caspasas inducida por doxorubicina en células Jurkat y U937 y son específicas por tipo celular.

Indicador de apoptosis			Células Jurkat	Células U937
Pérdida de potencial de membrana mitocondrial	Etapa		Intermedia	Temprana
	Dependencia de caspasas		No	No
	Participación de caspasas		Acelera el proceso	Acelera el proceso
Expresión de proteínas antiapoptóticas	Bcl-2		Disminución	No se altera
	Bcl-XL		Disminución	No se altera
	Mcl-1	Etapa temprana	Sobreexpresión	Sobreexpresión
		Etapa intermedia y tardía	Disminución	Disminución
Expresión de proteínas proapoptóticas	Subfamilia Bax	Bax	No se altera	No se altera
		Bak	No se altera	No se altera
	Subfamilia BH3	NOXA	Sobreexpresión temprana	No se expresa
		PUMA	No se expresa	Sobreexpresión temprana
Activación de Bax y Bak	Dependencia de caspasas		No	No
	Participación de proteína subfamilia BH3		NOXA	PUMA

las moléculas participantes y en la temporalidad dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, en la apoptosis inducida por la doxorubicina (DTX) *in vitro* destacan dos aspectos: la participación de proteínas de la familia Bcl-2 es necesaria para la activación de la apoptosis independiente de la actividad de las caspasas y la dependencia de las caspasas es específica del tipo celular (16, 17).

En ensayos *in vitro* con dos líneas celulares: células Jurkat de linfocitos T inmortalizados y células U937 de leucemia promonocítica, incubadas con DTX se comprobó que en ambos casos la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial requiere

de la activación de las caspasas -2,-3,-6,-7,-8 y -9, en su ausencia se genera un estado de pérdida intermedia del potencial que retrasa la liberación del citocromo C. En tal caso es posible la inducción a apoptosis de forma independiente a la actividad de caspasas, debido a la participación de proteínas de la familia Bcl-2 que contribuyen a la liberación del AIF y fragmentación del DNA. Sin embargo, la temporalidad de los eventos, la identidad y el nivel de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 difieren entre ambos tipos celulares (16).

En la tabla 1 se presenta un comparativo entre los eventos que conducen a la apoptosis, inde-

pendiente de caspasas, inducida por DTX en dos líneas celulares bajo las mismas condiciones de incubación; se destacan las diferencias en temporalidad y concentración e identidad de las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas entre ambas líneas celulares y con respecto al proceso activado por caspasas (16).

Por otra parte, también hay evidencia de diferencias en el tiempo de inducción a apoptosis entre fármacos del mismo tipo. Los antineoplásicos inhibidores de la topoisomerasa I o II aclarubicina (ACL), mitoxantrona (MTX) y DTX, difieren entre sí en el tiempo de inducción a la muerte celular; en los tres casos se encontraron células apoptóticas y necróticas, en diferentes proporciones. Los resultados concuerdan con los datos de los ensayos *in vitro* con el oxaliplatino, a menor tiempo transcurrido entre el daño al DNA y la muerte celular se incrementa el porcentaje de células que mueren por apoptosis. En el caso de las antraciclinas, la actividad de la caspasa-3 no es necesaria, sin embargo participa en la inducción a apoptosis en una etapa más temprana (15, 17).

En ensayos con células neoplásicas de fibroblasto de ratón (NIH 3T3) y de fibroblastos de peritoneo de hámster (B14) la ACL induce la muerte celular en una etapa más temprana y con mayor relación celular apoptosis/necrosis; en el extremo opuesto la MTX requiere de mayor tiempo y el mayor porcentaje de muerte es por necrosis. La sensibilidad a estas antraciclinas difiere entre las líneas celulares utilizadas en el ensayo. Ambas son igualmente sensibles a ACL, pero la sensibilidad a DTX y a MTX es diferente; las células B14 son 5 veces más sensibles a DTX y 2 veces más sensibles a MTX. Por otra parte, la MTX fue la antraciclina que provocó la mayor muerte celular, en un porcentaje mayor la muerte celular fue por necrosis y su LIC_{50} (concentración del fármaco a la cual en el 50% de la población se inhibe la división celular) fue diez veces menor que la IC_{50} de la ACL y de la DTX; estos resultados sugieren que a) La sensibilidad a estas antraciclinas es específica por tipo celular, b) Las antraciclinas pueden inducir la muerte celular por apoptosis y por necrosis, c) La relación apoptosis/necrosis inducida por las antraciclinas es dependiente del fármaco (17).

b) Antineoplásicos que inducen la apoptosis por la vía extrínseca tipo I: epotilona B, paclitaxol y 5-fluorouracilo

Apoptosis inducida por taxanos

Los taxanos epotilona B (EpoB) y paclitaxol (PTX) inducen la apoptosis en células de ovario OV-90

por la vía extrínseca tipo I (independiente de la mitocondria) mediada por el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). Las células vecinas a las células que entrarán en apoptosis liberan a TRAIL como una respuesta a la presencia en el medio de EpoB, PTX o sus intermediarios metabólicos (Fig. 2 a). TRAIL se dirige hacia las células que entrarán en apoptosis (Fig. 2 b), la unión con su receptor, que en el caso de los taxanos es el receptor DR4 o el DR5, tiene como efecto la oligomerización y reclutamiento de la proteína portadora del dominio de la muerte asociado a Fas (FADD) y de la caspasa-8 para formar el complejo de señalización de inducción a la muerte celular (DISC). Después de la formación de DISC (Fig. 2.c) se activa la caspasa-8 (Fig. 2.d), la cual a su vez activa a la caspasa-3 (Fig. 2.e). Este último evento induce a la apoptosis por la vía extrínseca independiente de mitocondria. (18, 19).

La apoptosis de las células OV-9 inducida por EpoB o por PTX tiene como elementos en común la participación de TRAIL como iniciador del proceso apoptótico y la necesidad de la activación de las caspasas -8 para lograr la activación de la caspasa-3. La expresión de TRAIL, caspasa-3 y caspasa-8 es mayor y se detecta en etapas más tempranas en las células incubadas con EpoB en comparación a las incubadas con PTX; aunque la expresión inicial de TRAIL en células incubadas con PTX es baja en las etapas tempranas, con el tiempo se incrementa lo suficiente para activar a la caspasa-8 (18).

La hidrólisis de PARP por la caspasa-3 activada conserva las reservas de ATP intracelular al inactivar el sistema de reparación del DNA que lo consume; en las células expuestas a PTX se observa mayor porcentaje de efectos genotóxicos en comparación a lo observado en células incubadas con EpoB. Esta diferencia probablemente se relaciona con el tiempo requerido para activar a la caspasa-3; en el caso de PTX un retraso podría llevar a la célula a mecanismos de escape de la apoptosis y permitir la duplicación del DNA dañado, es decir a conservar una célula neoplásica (19, 20).

El 5-fluorouracilo (5FU), un análogo de uracilo induce apoptosis por la vía extrínseca de acuerdo al mecanismo descrito anteriormente (Fig. 2). También se ha observado que después de la unión de TRAIL con DR5 se pueden activar las vías apoptóticas MAPK y JNK e inhibir las vías antiapoptóticas IP3k/AKT y NfκB, de manera que se reúnen las condiciones para muerte celular por apoptosis inducida por 5FU. Existe evidencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, de que 5FU actúa en sinergia con TRAIL para la inducción de la expresión de DR4 y DR5, el aumento de la expresión de las proteínas

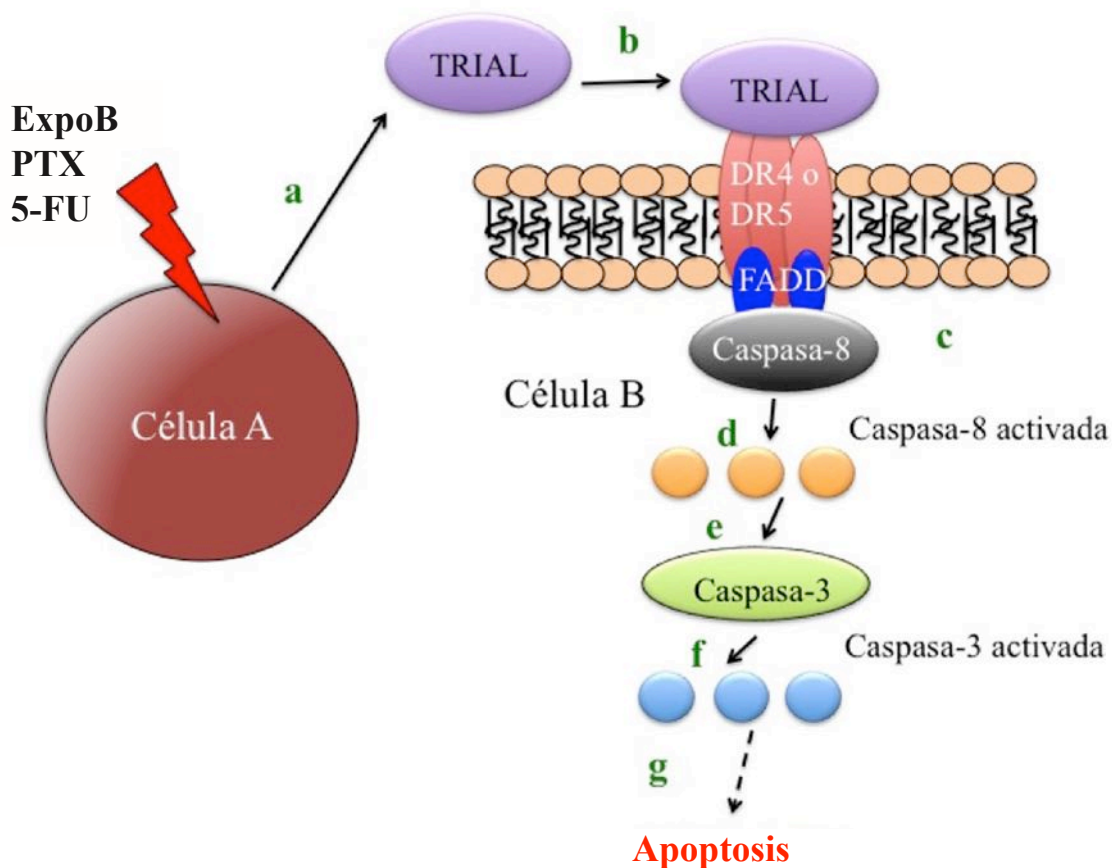


Figura 2. Mecanismo de la apoptosis inducida por taxanos y análogos de sustrato. La apoptosis extrínseca tipo I inducida por los taxanos EpoB y PTX y el análogo de sustrato 5-FU inicia con la liberación de TRIAL por la célula A, la formación de DISC después de la unión de TRIAL con los receptores DR4 o DR5 en la célula B activa a las caspasas -8 y -3; la caspasa-3 continúa el proceso independiente de la mitocondria que culmina en la muerte de la célula B por apoptosis. Abreviaturas: EpoB, epotilona B; PTX, paclitaxol; 5-FU, 5-fluorouracilo; TRAIL, ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; DR, receptor de la muerte; FADD, proteína portadora del dominio de la muerte asociado a Fas; DISC, complejo de señalización de inducción a la muerte celular.

proapoptóticas y la disminución de la expresión de las proteínas antiapoptóticas, con estos eventos se forma el complejo de señalización de inducción de muerte y se induce el proceso apoptótico (20, 21).

Heterogeneidad de efectos farmacológicos y toxicológicos en la apoptosis inducida por los antineoplásicos

El estudio de los mecanismos por los cuales los antineoplásicos inducen apoptosis enfrenta otros aspectos que aumentan su complejidad: a) No es posible establecer una relación lineal entre la concentración de las moléculas blanco del antineoplásico y sus efectos farmacológicos, b) No se puede correlacionar la magnitud del daño con la capacidad del antineoplásico para inducir apoptosis y c) En las células neoplásicas puede haber subpoblaciones con distintas respuestas al fármaco y a la dosis que dependen de su metabolómica.

a) Relación entre la concentración de la molécula blanco y el efecto farmacológico del antineoplásico

Las topoisomerasas I y II son la molécula blanco de las antraciclinas, su inhibición provoca tensión en la molécula de DNA durante la replicación y genera rompimiento en las cadenas; por lo tanto el porcentaje de DNA fragmentado y la cantidad de uniones covalentes DNA-topoisomerasa se utilizan como índices de daño por estos antineoplásicos.

En ensayos *in vitro* con líneas celulares de carcinoma de testículo (SuSa, 833K y GH) y de carcinoma de vejiga (RT4, RT112 y HT1376) incubadas con (m-AMSA), DTX y ectoposido (VP16) se cuantificó el porcentaje del DNA fragmentado y la cantidad de uniones covalentes DNA-topoisomerasa. Las líneas celulares derivadas de testículo fueron más sensibles a la acción de los fármacos que las líneas derivadas de vejiga. El índice de daño en las células de testículo fue hasta 20 veces mayor

que en las líneas celulares de vejiga; sin embargo, la cantidad de la topoisomerasa II fue solo el doble de la encontrada en células de vejiga. Estos datos indican que si bien el nivel de expresión de la topoisomerasa II determina la sensibilidad a las antraciclinas, no hay una relación lineal entre la expresión de la molécula blanco y los índices de daño, lo que sugiere que existen factores adicionales involucrados en el efecto farmacológico de estos antineoplásicos (22).

b) Correlación entre la magnitud del daño a la célula neoplásica y su efecto farmacológico

El mecanismo de acción de los agentes alquilantes es la formación de aductos con la molécula del DNA que provocan entrecruzamientos inter e intracatenarios y conducen a la apoptosis. En ensayos *in vitro* se incubaron once líneas celulares de linfoma de Burkitt con la mostaza nitrogenada HN2, un potente alquilante. No se encontraron diferencias entre las diversas líneas celulares con respecto al número de entrecruzamientos finales ni con respecto a su cinética de entrecruzamiento. Sin embargo, si se encontraron notables diferencias de sensibilidad entre las diferentes líneas celulares. La concentración necesaria para llevar a apoptosis al 50% de las células (LD_{50}) y la concentración necesaria para inhibir el crecimiento tumoral al 50% (ID_{50}) fueron significativamente menores en la líneas CA46 y MC116, mientras que las líneas Nawalwa y JLP119 fueron las más resistentes (23).

En otro estudio se obtuvieron resultados similares en células aisladas de cáncer metastásico de testículo y de vejiga incubadas con cisplatino (CPL). Las líneas celulares tumorales SuSa y 833K derivadas de testículo son altamente sensibles al CPL, mientras que las líneas celulares RT112 y RT4 de cáncer de vejiga se caracterizan por la resistencia al CPL relacionada con la frecuencia de mutaciones espontáneas inducidas por el antineoplásico. Las dos líneas celulares derivadas de cáncer vejiga fueron las de mayor frecuencia de mutaciones (células RT112) y las de frecuencia de mutación más baja (células RT4) lo que indica que no hay correlación entre la frecuencia de mutaciones como resultado de la formación de aductos entre el DNA y el CPL y la sensibilidad a este fármaco (24).

c) La sensibilidad a un mismo fármaco es diferente para cada subpoblación de células neoplásicas

Al incubar con Ara-C a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, las células de leucemia aguda (HL-60) que murieron durante las primeras 4 h lo hicieron por apoptosis; después de 8 h un 40% de la población

sobreviviente murió por apoptosis y entre las 12 y las 36 h el mayor porcentaje de las células que murieron lo hicieron por necrosis. Al aumentar la concentración de Ara-C la muerte celular ocurrió en menor tiempo, pero las proporciones de muerte por apoptosis/necrosis no se modificaron. Lo anterior reveló la existencia, dentro de una misma población celular, de subpoblaciones con diferente respuesta a una misma dosis y tipo de antineoplásico (25).

Apoptosis inducida por H_2O_2

El término "especies reactivas" se refiere a metabolitos del oxígeno molecular (ROS) o productos de la reacción entre el oxígeno y el nitrógeno (RNS) caracterizados por ser más reactivos que el O_2 a partir del cual se originaron. El H_2O_2 es una especie reactiva generada principalmente por la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) teniendo como sustrato al radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), y en menor proporción por otras oxidasas como las xantinas (26, 27, 28).

La concentración intracelular del H_2O_2 se encuentra en un rango desde picomolar hasta 100 μM , a las cuales participa en importantes procesos fisiológicos, entre ellos la inducción a apoptosis. No obstante, el H_2O_2 puede ser tóxico aún a estas concentraciones debido a que en presencia de metales de transición como el Fe^{2+} y el Cu^{1+} puede formar al radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), un radical altamente reactivo, involucrado en el daño oxidativo a lípidos, proteínas y DNA; el citocromo C y las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), tioredoxina y peroxiredoxina protegen a la célula del riesgo de daño oxidativo por el incremento de la generación de H_2O_2 (27, 28).

La evidencia de la participación de H_2O_2 en la inducción a apoptosis proviene de ensayos *in vitro* en donde se añade directamente el H_2O_2 al medio y se evalúan diversos marcadores de apoptosis y los resultados se contrastan con los obtenidos en presencia de algún antioxidante endógeno como la catalasa o exógeno como el antioxidante trolox. En timocitos incubados con 0.5-10 μM de H_2O_2 y sulfato ferroso (0.1 mM) se identificaron cambios estructurales y fragmentación del DNA característicos de apoptosis. La frecuencia de estos cambios en el DNA disminuyó al añadir trolox al medio de cultivo, lo que hace proponer al H_2O_2 como inductor de la apoptosis (29).

El papel del H_2O_2 como activador o inhibidor de la apoptosis depende de su interacción con el citocromo C, las proteínas MAPK, ERK, p38 y JNK, la proteína de choque térmico HSP27 y las caspasas -3, -8 y -9. La concentración de este oxidante es crítica, a una concentración menor a 100 μM el H_2O_2

Tabla 2

Participación del H₂O₂ como activador o inhibidor de la apoptosis. La concentración del H₂O₂ es un factor crítico, a concentraciones menores de 100 μ M actúa como activador de la apoptosis, a concentraciones iguales o mayores tiene un papel antiapoptótico.

Modelo	Molécula de interacción con H ₂ O ₂	Efecto proapoptótico del H ₂ O ₂	Efecto antiapoptótico del H ₂ O ₂
Células CHO (30)	Citocromo C	Inducción de actividad de peroxidasa	Autooxidación
Células MCF-7 (31)	MAPK, ERK, p38 y JNK	Activación por fosforilación	Inactivación por MKP-1
Células Jurkat (33, 34)	Caspasas -3, -8 y -9	Proteólisis de sitios internos	Oxidación de residuos de cisteína de sitios catalíticos
Células HeLa (32)	HSP27		Aumento de expresión

actúa como inductor de la apoptosis, mientras que a una concentración igual o mayor se sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes y se inhibe el proceso apoptótico (30).

En células de ovario de hámster (CHO) el H₂O₂ es un inductor de la apoptosis mediada por la liberación del citocromo C cuando su actividad de peroxidasa oxida a la cardiolipina; a concentraciones de H₂O₂ mayores a 100 μ M induce la autooxidación del citocromo C que provoca el rompimiento del enlace Fe-Met₈₀ y la inhibición de la apoptosis (30).

En células MCF-7 derivadas de cáncer de mama el H₂O₂ induce apoptosis independiente de caspasas mediada por la fosforilación de las proteínas MAPK, ERK, p38 y JNK; el aumento de la concentración de H₂O₂ incrementa la expresión de MKP-1, una proteína de respuesta temprana al estrés que inhibe la activación de la apoptosis por las vías p38 y JNK (31).

En células HeLa los microtúbulos del citoesqueleto se fragmentan cuando las células se incuban con H₂O₂ a una concentración menor de 100 μ M. A partir de 100 μ M de H₂O₂ se encontró un incremento de la expresión de la proteína de choque térmico HSP27, así como su fosforilación mediada por la MAPKAP cinasa-2. La proteína HSP27 activada actúa como proteína de protección de la actina-F y evita la apoptosis (32).

Apoptosis mediada por el daño oxidativo generado por los antineoplásicos

El daño oxidativo se refiere a la oxidación de las macromoléculas: carbohidratos, lípidos, proteínas o ácidos nucleicos por ROS o RNS que provoca alte-

raciones estructurales y funcionales, y tiene como resultado daños metabólicos, alteraciones celulares e incluso la muerte por apoptosis o necrosis (28).

El tratamiento con antineoplásicos puede incrementar el estrés oxidativo y modificar la actividad del sistema antioxidante. Se han realizado diversos ensayos, en su mayoría *in vitro*, para dilucidar si el estrés oxidativo es un mecanismo de acción requerido para el efecto farmacológico de los antineoplásicos o es parte de su toxicidad.

Apoptosis inducida in vitro por el metabolismo de la ciclofosfamida

La CTX tiene una biotransformación por el citocromo P450 hepático y como resultado se produce la mostaza fosforamida (PAM), el metabolito con actividad antineoplásica responsable de la formación de aductos con el DNA que conducen a la activación de la apoptosis. En las etapas iniciales de la biotransformación se forman metabolitos altamente inestables, entre ellos el 4-hidroxiperóxido (4-HC) que se convierte sin activación metabólica en 4-hidrociclofosfamida (4-hidroxi-CTX), este último es el precursor de PAM. Durante la transformación de 4-HC a 4-hidroxi-CTX se produce H₂O₂ y, mediante la reacción de Fenton se genera $\cdot$ OH. El hidroxilo forma aductos que provocan la fragmentación del DNA e inducen la muerte por apoptosis (35).

Se ha demostrado la relación entre el incremento en la generación de H₂O₂ durante la transformación del 4-HC, el daño al DNA y la activación de la apoptosis. En células HL-60 aisladas de leucemia humana, incubadas por separado con 4-HC o con CTX el porcentaje de células con daño al DNA

Tabla 3

Esquema que muestra el incremento de especies reactivas del oxígeno y alteraciones al sistema antioxidantes por efecto de los antineoplásicos. En diversos ensayos se ha observado un incremento en la generación de ROS, principalmente H_2O_2 como efecto de los antineoplásicos. El incremento en la generación de ROS modifica la concentración y la actividad de diversos componentes del sistema antioxidante y provoca daño oxidativo. Las $\uparrow$ indican incremento y $\downarrow$ disminución. Abreviaturas: ROS, especies reactivas del oxígeno; CTX, ciclofosfamida, DTX, doxorubicina; 5-FU, 5-fluorouracilo; MTX, metotrexano; vinicristina, VCT; procarbazona (PCZ); cisplatino, CPL; dactinomicina, DTM; bleomicina, BMA; LPX, lipoperoxidación; TAC, capacidad antioxidante total; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GPX, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S transferasa, GR, glutatión reductasa.

Modelo	Anti-neoplásico	ROS (Generación)	Daño Oxidativo		Sistema Antioxidante		
					Enzima (Actividad)	Endógenos (Concentración)	Exógenos (Concentración)
Leucocitos aislados de linfomas y sarcoma (34)	BMA	$O_2^{\cdot-}$ $H_2O_2 \uparrow$	$\uparrow$				
Sangre y plasma de pacientes diversos tipos de cáncer (42, 43)	CTX, 5-FU y DTX	$\uparrow$	$\uparrow$				
Plasma de pacientes cáncer de pulmón (37)	DTX y CTX		$\uparrow$	$\downarrow$			
Células humanas cáncer próstata (44)	CPL	$H_2O_2 \uparrow$	$\uparrow$				
Cardiomiocitos (38)	DTX	$H_2O_2 \uparrow$			GPX $\downarrow$		
Tejido cardíaco de ratas (35)	CTX		$\uparrow$		SOD, CAT, GPX, GST, GR $\downarrow$	Ceruloplasmina $\downarrow$	Vitaminas E C $\downarrow$
Tejido renal de ratas (37)	CPL				CAT, SOD GPX $\downarrow$		
Enterocitos de ratas (40)	MTX	$\uparrow$					

(fragmentación y formación de aductos 8-oxodG) y de células en apoptosis fue mayor cuando se incubaron con 4-HC; el efecto fue mayor al añadir NADH y Cu(II) al medio y disminuyó en presencia de catalasa y quelantes de cobre y no se observó en las células HP100, una clona que expresa una actividad de catalasa 18 veces mayor que HL-60. Los autores sugieren que la generación de H_2O_2

en la conversión de CTX en 4-HC podría contribuir, junto con el entrecruzamiento de las cadenas de DNA provocado por PAM, a la apoptosis inducida por CTX (35). Si bien estos resultados sugieren que la apoptosis inducida por CTX depende de la generación de H_2O_2 durante el metabolismo del fármaco, *in vivo* no se ha demostrado la relación entre el estrés oxidativo y la apoptosis. La eviden-

cia *in vivo* indica que la activación de la apoptosis depende de la formación de aductos entre PAM y el DNA sin la participación del estrés oxidativo (36).

Nefrotoxicidad inducida por el metabolismo del cisplatino

La apoptosis de células neoplásicas inducida por el tratamiento con cisplatino se activa por la formación de aductos entre el fármaco y el DNA y de entrecruzamientos, intra e intercatenarios en esta molécula. Se ha encontrado que el tratamiento con cisplatino está asociado al daño oxidativo: aumenta la concentración de malondialdehído, disminuye la concentración de glutatión de reducido (GSH) y la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPX) en riñón y testículos de ratas. La nefrotoxicidad es uno de los principales efectos toxicológicos del tratamiento con cisplatino y se ha relacionado con la apoptosis de células del túbulo renal. La mitocondria es uno de los blancos del daño oxidativo debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilo de algunas proteínas mitocondriales, a la inhibición de la entrada de calcio y a la reducción del potencial de membrana; el daño oxidativo a enzimas de la cadena respiratoria provoca la disminución de los niveles de ATP, el aumento en la lipoperoxidación y la reducción de la actividad del sistema antioxidante en tejido renal (37).

Efecto toxicológico y farmacológico del metabolismo de la doxorubicina

En células endoteliales aórticas de bovino (BAEC) y en cardiomiocitos el tratamiento con DTX incrementa la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Durante el metabolismo de la DTX se genera H_2O_2 , el cual junto con el aumento del flujo de Ca^{2+} induce la expresión de eNOS, el incremento en la velocidad de generación de $\cdot NO$ activa señales proapoptóticas. La participación del estrés oxidativo en la toxicidad del tratamiento con DTX se corrobora debido a que el co-tratamiento con antioxidantes aumenta la expresión de las proteínas antiapoptóticas Hsp70 y Bcl2 (29). Por otra parte, la apoptosis inducida por DTX en células neoplásicas es provocada por su interacción con la topoisomerasa I y no se ha comprobado la participación del estrés oxidativo (38).

Incremento de especies reactivas del oxígeno y alteraciones en el sistema antioxidante durante el tratamiento con antineoplásicos

La evidencia *in vivo* e *in vitro* demuestra que el metabolismo óxido-reductor de los antineoplásicos incrementa la generación de ROS, principalmente de H_2O_2 y puede alterar la concentración o la acti-

vidad de los componentes del sistema antioxidante y causar daño oxidativo en células libres de cáncer. El estrés oxidativo podría contribuir a la toxicidad asociada al tratamiento con antineoplásicos.

En ensayos *in vitro* con cardiomiocitos se detectó un incremento en la generación de H_2O_2 acompañado de la disminución de la actividad de GPX, la enzima antioxidante más abundante en el corazón y principal mecanismo de reducción del H_2O_2 en este órgano; lo que hace suponer que la cardiotoxicidad, un efecto tóxico secundario muy grave durante el tratamiento con DTX, es consecuencia de estas alteraciones en el metabolismo oxidativo (39). En estudios con ratas se observó un aumento en la LPO del tejido renal, disminución de las enzimas SOD, CAT y GPX y aumento de apoptosis después de una dosis única de CPL; es probable que de esta forma se genere la nefrotoxicidad, una de las principales toxicidades de este fármaco (37).

El aumento del estrés oxidativo inducido por antineoplásicos en órganos libres de cáncer se ha detectado incluso cuando el fármaco no ingresa al órgano afectado. La inflamación generalizada de las mucosas, mucositis, es uno de los efectos tóxicos más frecuentes e inespecíficos del tratamiento con antineoplásicos y uno de los factores que provocan náusea y diarrea inmediatamente después de la administración, aun cuando el fármaco o sus metabolitos no se han distribuido sistémicamente. El incremento de la permeabilidad celular de los enterocitos se relaciona con el aumento de la generación de ROS, mayor actividad de mieloperoxidasa y una mayor LPO en fragmentos de intestino aislados de ratas previamente tratadas con MTX lo que indica que estos cambios no son provocados por la entrada directa del antineoplásico a la célula (40).

La alteración de la memoria a corto plazo, la disminución de la capacidad de orientación espacial, los problemas motrices y de concentración durante o después de haber recibido tratamiento con antineoplásicos que presentan algunos pacientes es conocido como "chemo brain". Este efecto tóxico resulta de particular interés debido a que no obstante la imposibilidad de los fármacos o sus metabolitos para atravesar la barrera hematoencefálica, por medio de técnicas de imagen se han detectado cambios morfológicos en el cerebro asociados con incremento de LPO en plasma, y en modelos animales se ha detectado daño oxidativo en lípidos y proteínas del cerebro y aumento de la apoptosis neuronal (41, 42, 43, 44). En ensayos animales se ha detectado un aumento de la concentración del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en el

cerebro de animales tratados con antineoplásicos, es factible que el $O_2^{\bullet-}$ generado durante el metabolismo de DTX induzca la oxidación de proteínas en plasma y con ello se incrementa la secreción de TNF- α por macrófagos; el TNF- α puede llegar al cerebro, atravesar la barrera hematoencefálica y generar estrés oxidativo al aumentar la actividad de la NOS (42).

El tratamiento con antioxidantes y la efectividad del antineoplásico

El estrés y el daño oxidativo pueden disminuirse al administrar antioxidantes antes o durante el tratamiento con antineoplásicos. En ensayos *in vivo* el escualeno evitó la disminución de la actividad enzimática de SOD, CAT, GTX, GR y GST y de la concentración de vitamina C, vitamina E y ceruloplasmina en plasma provocado por CTX (45), el licopeno disminuyó la nefrotoxicidad durante el tratamiento con CPL (46) y la N-acetilcisteína los efectos del MTX en los enterocitos (40, 47). En grupos de pacientes bajo distintos esquemas de tratamiento también se han reportado mejorías en el estado general cuando el tratamiento antineoplásico va acompañado de la administración de antioxidantes. Los resultados *in vivo* y en pacientes sugieren que el uso de antioxidantes no disminuye la eficacia de los antineoplásicos y si contribuye a disminuir el daño oxidativo provocado por estos fármacos.

Aumento de la concentración de GSH y la resistencia al cisplatino

No obstante la evidencia a favor del empleo de antioxidantes durante el tratamiento con antineoplásicos, su uso se toma con cautela ante la posibilidad de que el estrés y el daño oxidativo sean necesarios para lograr el efecto farmacológico de los antineoplásicos. Más aún en algunos casos se ha encontrado una correlación entre el aumento de la concentración de los antioxidantes y la resistencia al antineoplásico.

En varios trabajos se ha encontrado correlación entre la concentración de GSH y la quimioresistencia al CPL. En las células Hep2 de carcinoma humano de laringe, resistentes al cisplatino, la concentración de GSH es mayor que en las líneas celulares sensibles a este antineoplásico (48). Incluso en las células resistentes, como las células tumorales T24 de vejiga, la inducción a apoptosis por cisplatino aumenta cuando las concentraciones intracelulares de GSH disminuyen (49).

La resistencia al CPL y su relación con la concentración de GSH puede ser el resultado de varios

procesos: a) Conjugación del GSH con el cisplatino para facilitar su salida de la célula; b) Reducción de la formación de aductos entre el cisplatino y el DNA debido a la conjugación entre el GSH y el cisplatino, c) Inhibición de la apoptosis por BCL-2 mediada por una vía antioxidante regulada por los niveles de GSH.

a) Conjugación del GSH con el cisplatino para facilitar la salida de la célula

El GSH se conjuga con el cisplatino por la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST), el CPL conjugado con GSH puede salir de la célula por medio de los transportadores MRP2/cMOAT y MRP1/GS-X (50). Sin embargo, la correlación entre la formación del conjugado de cisplatino parece ser específica para ciertos tipos celulares; en líneas celulares de glioblastoma, adenocarcinoma de colon y de pulmón (52, 53) la expresión de GST es mayor en las células quimioresistentes pero en células de cáncer de ovario (52) o de pulmón (51) no se ha encontrado correlación entre la quimioresistencia al CPL y el nivel de expresión de GST. De la misma manera, algunas líneas resistentes al CPL tienen mayor número de transportadores MRP2/cMOAT y MRP1/GS-X en comparación a las líneas sensibles (53).

b) Inhibición de la formación de aductos entre el cisplatino y el DNA debido a la conjugación entre el GSH y el cisplatino

Los resultados de los ensayos *in vitro* con células HeLa o Me 665 de melanoma indican una relación entre el nivel de expresión de la gamma glutamil transpeptidasa (GGT), la conjugación entre el CPL y el GSH y la resistencia al fármaco (54), lo que sugiere que la conjugación del CPL con el GSH impide la unión del antineoplásico con otros nucleófilos celulares, como el DNA e inhibe la formación de aductos necesaria para la inducción a la apoptosis (53). Sin embargo, en ensayos *in vivo* ocurre lo contrario, a mayor expresión de la GT mayor eficacia del cisplatino lo que quiere decir que *in vivo* no hay una relación entre la actividad enzimática de la GGT y la apoptosis inducida por CPL (53, 55).

c) Inhibición de la apoptosis por BCL-2 mediada por una vía antioxidante regulada por los niveles de GSH

Diversos trabajos sugieren que la proteína BCL-2 inhibe la apoptosis mediante una vía antioxidante, especialmente a través de la regulación de los niveles de GSH. En células HeLa la sobreexpresión

de BCL-2 inhibe en un 30% la actividad de los transportadores RsGshT sinusoidales dependientes de metionina y responsables de la salida del GSH al plasma y no modifica la actividad de la gamma glutamilcisteína sintetasa (GGS), la enzima que forma al GSH; por lo tanto la concentración intracelular de GSH aumenta en un 60% (56), el GSH llega al núcleo en donde actúa como un inhibidor de la actividad de las caspasas. Se ha demostrado que la actividad antiapoptótica de BCL-2 se debe a su capacidad para regular la concentración del GSH, la adición de N-acetilcisteína al medio o añadir directamente el GSH al interior del núcleo inhibe la apoptosis aun en células que sobreexpresan BCL-2. Por otra parte, en células derivadas de linfoma de ratón incubadas con dietil maleato o diamina, como agentes que disminuyen la concentración de GSH, se incrementa la susceptibilidad a la apoptosis inducida por radiación en células que sobreexpresan BCL-2, lo que confirma que el papel antiapoptótico de BCL-2 se debe a su capacidad para regular las concentraciones intracelulares de GSH (57).

La proteína BCL-2 puede inhibir la apoptosis por una vía actividad por H_2O_2 a concentraciones iguales o mayores de 100 μM ; esta activación puede conducir al incremento de la actividad de SOD citoplasmática en las células NT-2 (teratocarcinoma) y de catalasa en células de neuroblastoma (SK-N-MC). El incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes no impide la LPO o el daño al DNA en ninguna de las dos líneas celulares (58). Sin embargo, BCL-2 no repara el daño al DNA, la inhibición de la apoptosis por sobreexpresión de BCL-2 en las células con daño oxidativo puede incrementar la tasa de la mutagénesis, incrementando el riesgo de carcinogénesis (59).

Diferencias en la sensibilidad a los antineoplásicos entre células neoplásicas y células no neoplásicas

Existen diferencias entre las células cancerosas y las células no cancerosas en cuanto a la relación entre la concentración de especies reactivas del oxígeno y la sensibilidad a los antineoplásicos. Las alteraciones metabólicas de las células cancerosas, especialmente el aumento del metabolismo anaeróbico durante el llamado efecto Walburg, producen un estado inherente de estrés oxidativo. Se ha encontrado que en las células neoplásicas la generación de ROS y RNS es mayor que en células no neoplásicas, y existe un incremento de la expresión de proteínas antioxidantes como SOD y catalasa, probablemente como un mecanismo de protección contra el daño oxidativo. Así mismo, el aumento en la concentración de ROS durante el

tratamiento con algunos antineoplásicos induce un incremento en su capacidad antioxidante.

En ensayos con células de leucemia el 2-metoxiestradiol (2-ME) inhibe la actividad de SOD e inducen la acumulación de superóxido ($O_2^{\cdot -}$) como parte de su mecanismo de acción y parece ser selectivo para células cancerosas. De igual manera se ha encontrado que en células aisladas de pacientes con cáncer de ovario, la inhibición de SOD por 2-ME también induce la apoptosis. Estos datos sugieren que el $O_2^{\cdot -}$ participa en la inducción a la apoptosis, y apoya la hipótesis de que la actividad de las enzimas antioxidantes es mayor en las células neoplásicas; sin embargo no son concluyentes debido a que la expresión de SOD varía entre células y tejidos y en algunos casos incluso es menor en células neoplásicas (60).

Empleo de antioxidantes sin disminución del efecto farmacológico de los antineoplásicos

En contraste con la evidencia del efecto antiapoptótico de los antioxidantes *in vitro*; en modelos animales se ha demostrado que la coadministración con antioxidantes no disminuye el comportamiento antitumoral de DTX ni de CPL, sino que además, aumenta la supervivencia de los animales (61). Adicionalmente, en ratones con carcinoma de colon tratados con catalasa intravenosa se puede observar una reducción de las metástasis a hígado (62).

En líneas celulares de carcinoma de mama humano, la incubación con vitamina C aumentó el efecto farmacológico de la DTX, el CPL y el paclitaxel aún en aquellas líneas celulares resistentes a los antineoplásicos (63). De la misma manera, en las células neoplásicas escamosas incubadas con el CPL y con el carboplatino, el 1,25-dihidroxi-16-ine-colecalciferol (Ro23-7553), un análogo del metabolito activo de la vitamina D, incrementó el número de las células que se mantuvieron en arresto en G_0 - G_1 , redujo el tamaño del tumor así como el número y tamaño de las metástasis (64).

Por otra parte, el tratamiento con una mezcla de plantas con propiedades antioxidantes, usadas en la medicina tradicional china en un modelo animal de cáncer hepático tratado con DTX, disminuyó la LPO y aumentó la concentración del GSH y la actividad de las enzimas CAT y SOD, también disminuyó la apoptosis de células no neoplásicas del riñón (órgano no afectado) y en el hígado (órgano afectado por cáncer) sin diferenciar células neoplásicas o no neoplásicas y no obstante la menor apoptosis global de las células del órgano afectado la supervivencia de los animales se incrementó en 50% (65).

Así mismo, la administración diaria de vitamina C (2 g/Kg) a ratones y cobayos con leucemia

tratados con DTX (5 mg/kg), protegió del daño estructural a los miocardiocitos, evitó el aumento de LPO en el corazón y prolongó el periodo de sobrevivencia del animal (66).

Terapéutica en el uso de antioxidantes en el cáncer

Se estima que el consumo de antioxidantes por pacientes durante el tratamiento con antineoplásicos varía entre 10-87%, el amplio rango se debe a diferencias por tipo de cáncer, edad, educación, nivel socioeconómico y grupo étnico. En muchos casos los pacientes toman la decisión de utilizar antioxidantes como suplemento, con o sin la autorización del médico; en los casos en donde los antioxidantes se han utilizado como parte del tratamiento para aliviar los efectos tóxicos indeseables predomina el uso de glutatión, melatonina, vitaminas A, C y E, N-acetilcisteína, ácido elágico y mezclas de plantas medicinales propias de la cultura local. En una revisión del estado del arte Block y cols. encontraron que el uso de GSH en protocolos clínicos disminuía en 58% o más la neurotoxicidad, permitía completar los ciclos de tratamiento con antineoplásicos programados e incrementaba la sobrevivencia; en el 35% de los pacientes que tomó melatonina disminuyeron síntomas relacionados con los efectos secundarios a corto plazo: pérdida de peso, náuseas, vómito, fatiga y no se encontraron diferencias en la sobrevivencia entre estos pacientes y el grupo control. Solo un protocolo que utilizó N-acetilcisteína cumplió los criterios de inclusión del análisis efectuado por Block y cols., el objetivo inicial del uso de este antioxidante era prevenir la cardiotoxicidad, no se encontraron diferencias entre los pacientes tratados y aquellos que recibieron placebo, no obstante el 50% de los pacientes tratados con el antioxidante tuvieron remisión parcial, contra el 35% de los que consumieron un placebo; en el caso del empleo de vitamina C o mezcla de hierbas de la medicina tradicional no se encontraron diferencias entre los pacientes tratados y el grupo control, mientras que con el uso de las vitaminas A y E el porcentaje de pacientes que mostraron mejoría fue significativamente mayor al compararlos con los pacientes que recibieron placebo (67).

No obstante lo anterior, el uso de antioxidantes no es una práctica estándar durante el tratamiento con antineoplásicos. La cautela en su uso se debe en parte, a la falta de certeza sobre la participación del estrés oxidativo en el efecto farmacológico de

los antineoplásicos. Aun cuando existe evidencia *in vitro* que apoya lo anterior, en ensayos *in vivo* se ha comprobado que el estrés oxidativo forma parte de la toxicidad y no participa en la apoptosis inducida por los antineoplásicos.

Los resultados de ensayos *in vivo* y de protocolos clínicos sobre el uso de antioxidantes son alentadores, no obstante es preciso continuar con las investigaciones al respecto que permitan a) Homologar condiciones de ensayo y establecer criterios para hacer comparativos los resultados y cuantificar el beneficio del tratamiento, b) Ampliar el número de fármacos a estudiar y diseñar ensayos con combinaciones de antineoplásicos tal como ocurre en el tratamiento con los pacientes, c) Considerar la heterogeneidad del tumor y las diferentes respuestas al antineoplásico de las clonas de células neoplásicas que lo forman.

Conclusiones

El H_2O_2 es un inductor de la apoptosis y en el caso de algunos fármacos se genera durante su metabolismo, esta evidencia ha hecho suponer que el estrés oxidativo es requerido para el efecto farmacológico. Sin embargo, se ha demostrado que el H_2O_2 induce a apoptosis por vías diferentes a las que utiliza para generar su efecto oxidante sistémico y que los antioxidantes reducen los efectos tóxicos oxidantes en células no neoplásicas sin disminuir la apoptosis de las células neoplásicas inducida por los antineoplásicos. Los antioxidantes protegen del daño oxidativo a los órganos libres de cáncer e incluso, en algunos casos, pueden potenciar el efecto antitumoral de los fármacos disminuyendo las metástasis o aumentando las probabilidades de sobrevivencia.

Los resultados a favor y en contra del uso de los antioxidantes deben analizarse en su contexto, la interacción antineoplásico-célula-antioxidante depende del tipo de fármaco o de la combinación de ellos en el tratamiento, del tipo de cáncer y de las subclonas que forman parte de la población tumoral, del tipo y combinación de antioxidantes y de condiciones genéticas y fisiológicas particulares de la persona enferma de cáncer.

La mejor comprensión del proceso de interacción antineoplásico-célula neoplásica-antioxidante es indispensable para establecer las condiciones del uso de los antioxidantes para proteger a los órganos libres de cáncer de los efectos tóxicos de los antineoplásicos sin disminuir el efecto farmacológico de éstos sobre las células neoplásicas. 

REFERENCIAS

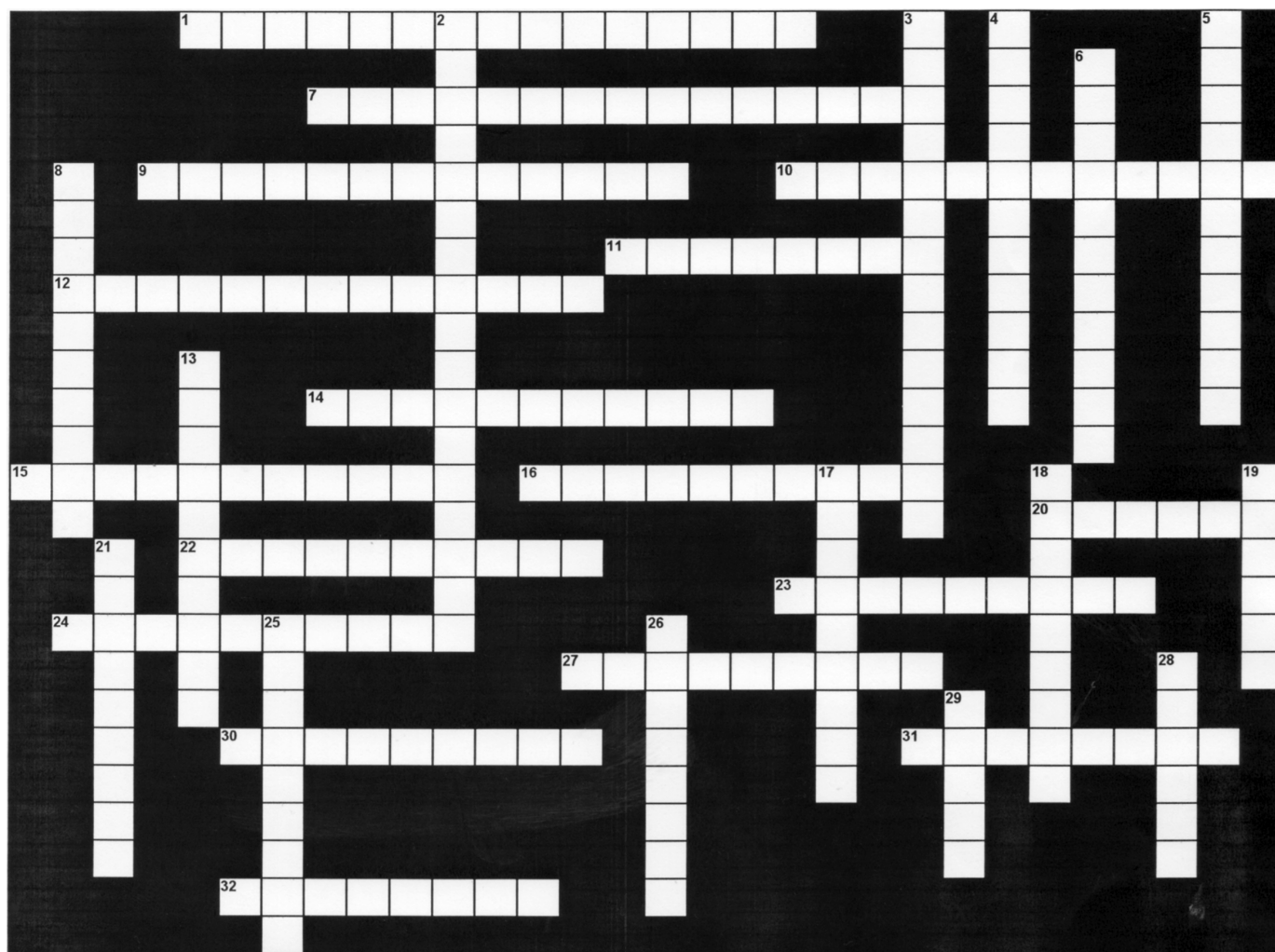
1. Almendro V, Marusyk A y Polyak K (2013) Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 8:277-302
2. Priestman T (2012) *Cancer Chemotherapy in Clinical Practice*, Second Edition. Springer-Verlag, London, UK, pp 2-42.
3. Nowel P (1976) The clonal evolution of tumor cell population. *Science*, 194: 23-28.
4. Hanahan D. y Weinberg R. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144: 646- 674.
5. Dy GK. y Adjei AA (2006) Principles of Chemotherapy. En *Oncology: An evidence-based approach*. Editor Chang A. Springer U.K. pp 14-40.
6. Burchman PC (2004) *An Introduction to Toxicology*. Springer, UK. pp 29-50.
7. Weij NI, Cleton FJ y Osanto S (1997) Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treatment Review* 23:209-240.
8. Aktipis CA, Boddy AM, Gatenby RA, Brown JS y Maley CC (2013) Life history trade-offs in cancer evolution. *Nature Rev. Cancer* 13:883-892.
9. Hickman JA (1992) Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews* 11:121-139.
10. Simões AP, Olie R, Gautschi O, Leech SH, Häner R, Hall J, Fabbro D, Stahel RA y Zangemeister-Wittke U (2000). bcl-xL antisense treatment induces apoptosis in breast carcinoma cells. *Int. J. Cancer* (87):582-590.
11. Chakraborty S, Mazumdar M, Mukherjee S, Bhattacharjee P, Adhikary A, Manna A, Chakraborty S, Khan P, Sen A, y Das T (2014) Restoration of p53/miR-34a regulatory axis decreases survival advantage and ensure Bax-dependent apoptosis of non-smal cell lung carcinoma cells. *FEBS Letters* (588):549-559.
12. Marzo I y Naval J (2008) Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* (76):939-946.
13. Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H y Toge T (2002). Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* (50):343-352.
14. De Vos M, Schreiber V, Dantzer F (2012) The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of art. *Biochemical Pharmacology* (84):137-146.
15. Wu P, Zhu X, Jin W, Hao S, Liu Q y Zhang L (2015) Oxaliplatin triggers necrosis as well as apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *Biochem and Biophys Research Comm* (460):183-190.
16. López-Royuela N, Pérez-Galán P, Galán-Malo P, Yuste VJ, Anel A, Susín SA, Naval J y Marzo I (2010) Different contribution of BH3-only proteins and caspases to doxorubicin-induced apoptosis in p53-deficient leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* (79):1746-1758.
17. Koceva-Chyta A, Jedrzejczak M, Skierski J, Kania K y Józwiak Z (2005) Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: Relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis* (10):1497-1514.
18. Rogalska A, Marczak A (2015) Epothilone B induces human ovarian cancer OV-90 cell apoptosis via external pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (39):700-712.
19. Johnstone RW, Frew AJ y Smyth MJ (2008) The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset progression and therapy. *Nature Reviews Cancer* (8): 782-798.
20. Holoch PA y Griffith TS (2009) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): A new path to anti-cancer therapies. *European Journal of Pharmacology* (625):63-72.
21. Wang H, Yang T y Wu X (2015) 5-Fluorouracil preferentially sensitizes mutant KRAS non-smal cell lung carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Molecular Oncology* (9):1815-1824.
22. Fry AM, Chresta CM, Davies SM, Walker MC, Harris AL, Hartley JA, Masters JRW y Hickson DI (1991) Relationship between Topoisomerase II Level and Chemosensitivity in Human Tumor Cell Lines. *Cancer Research* (51):6992-6995.
23. O'Connor PM, Wassermann K, Sarang M, Magrath I, Bohr VA y Kohn KW (1991) Relationship between DNA Cross-Links, Cell Cycle and Apoptosis in Burkitt's Lymphoma Cell Lines Differing in Sensitivity to Nitrogen Mustard. *Cancer Research* (51):6550-6557.
24. Parris, CN, Walker, MC, Masters JW y Arlett C (1990) Inherent Sensitivity and Induced Resistance to Chemotherapeutic Drugs and Irradiation in Human Cancer Cell Lines: Relationship to Mutation Frequencies. *Cancer Research* (50):7513-7518.

25. Jianfeng Z, Yan C, Chongyu L, Jianping X, Dongjiao Y, Ping Z y Bianming W (1997) Ara-C induced apoptosis in human myeloid leukemia cell line HL-60: inducing apoptosis is the primary mechanism of chemotherapy. *Chinese Journal of Cancer Research* (3):183-187.
26. Seis H (2007) Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a concept. *The Journal of Nutrition*. 137:1493-1495
27. Halliwell B (1999) Free radicals in biology and medicine. NY, Oxford University Press.
28. Konigsberg-Fainstein, M (2008) Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. México. Manual Moderno
29. Forrest V, Kang Y y McClain DE (1994) Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. *Free Radical Biology & Medicine* (16):675-684.
30. Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Potapovich AI, Kini V, Amoscato AA y Fujii Y (1994) Interactions of cytochrome C with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radical Biology & Medicine* (37):1963-1985.
31. Zohu JY, Liu Y y Wu GS (2006) The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in oxidative damage-induced cell death. *Cancer Res* (9):4888-4894
32. Huot J, Houle F, Spitz DR y Landry J (1996) HSP27 Phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* (56):273-279.
33. Salvensen GS y Dixit V (1997) Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* (91):443-446.
34. Barbouti A, Amorgianiotis C, Kolettas E, Kanavaros P y Galaris D (2007) Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radical Biology & Medicine* (43): 1377-1387.
35. Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S y Kawanishi S (2004) Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radical Biology & Medicine* (6):793-802.
36. Emadi A, Jones RJ y Brodsky RA (2009) Cyclophosphamide and Cancer: Golden Anniversary. *Nature Rev Clin Oncol* (6):638-647.
37. Saad S, Najjar Tao y Alashari M (2004) Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin and Exper Pharm and Phys* (31):862-867.
38. Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J y Kalyanaraman B (2001) Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* (276):47266-47276.
39. Doroshov J, Locker G y Myers CE (1980) Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. *J Clin Invest* (65):128-135.
40. Maeda T, Miyazono Y, Ito K, Hamada K, Sekine S y Horie T (2010) Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol* (65):1117-1123.
41. Weijl NI, Cleton FJ y Osanto S (1997) Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treatment Reviews* (23):209-240.
42. Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA y St. Clair DK (2007) Collateral damage in cancer chemotherapy: Oxidative stress in nontargeted tissues. *Molecular Interventions* (3): 147-156.
43. Sangeetha U, Das N, Koratkar R y Suryaprabha P (1990) Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Radical Biology & Medicine* (8):15-19.
44. Look MP y Musch E (1994). Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy* (40):8-15.
45. Senthilkumar S, Yogeeta SK, Subashini R y Devaki T (2006) Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. *Chemico-Biological Interactions* (160):252-260.
46. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO y Karaoglu A (2005) Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* (212):16-123.
47. Itoh T, Terazawa R, Kojima K, Nakane K, Deguchi T, Ando M, Tsukamasa Y, Ito M y Nozawa Y (2010) Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cell. *Free Radical Research* (9):1033-1039.
48. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A y Osmak M (2010) The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology* (40):347-359.
49. Byun SS, Kim SW, Choi H, Lee C y Lee E (2005). Augmentation of cisplatin sensibility

- in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU International* (95): 1086-1090.
50. Suzuki H y Sugimaya Y (1998) Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Seminars in Liver Disease* (18):359-375.
 51. Steward DJ (2010). Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (75):173-234.
 52. Van der Zee AGJ, Van Ommen B, Meijer C, Hollema H, van Bladeren PJ y de Vries EGE (1992). Glutathione S-transferase activity and isoenzyme composition in benign ovarian tumours, untreated malignant ovarian tumors, and malignant ovarian tumours after platinum/cyclophosphamide chemotherapy. *Br. J. Cancer* (66):930-936.
 53. Chen HH y Kuo MT (2010). Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Metal-Based Drug*. 43 0939. doi:10.1155/2010/430939
 54. Hanigan M, Gallagher BC, Townsend DM y Gabarra V (1999) γ -glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis* (20):553-559.
 55. Franzini M, Corti A, Lorenzini E, Paolicchi A, Pompella A, De Cesare M, Perego P, Gatti L, Leone R, apostoli P y Zunino F (2006) Modulation of cell growth and cisplatin sensitivity by membrane γ -glutamyltransferase in melanoma cells. *European Journal of Cancer* (42):2623-2630.
 56. Meredith M, Cusik C, Soltaninassab, Sekhar K, Lu S y Freeman ML (1998) Expression of Bcl-2 increases intracellular glutathione by inhibiting methionine-dependent GSH efflux. *Biochemical and Biophysical Research Comm* (248):458-463.
 57. Voehringer DW (1998) BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radical & Medicine* (27):945-950.
 58. Lee M, Hyun DH, Marshall KA, Ellerby LM, Bredesen DE, Jenner P y Halliwell B (2001) Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *Free Radical Biology & Medicine* (31):1550-1559.
 59. Chernobennel-Lasserre C y Dosanjh MK (1997) Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-XL promotes survival and mutagenesis after oxidative damage. *Biocimie* (79):613-617.
 60. Oldham E, Liu J, Albitar M, Keating MJ y Huang P (2004) Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for the therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol* (53):209-219.
 61. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuist GJ y H Joenje (1990). Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanism of cytotoxicity. *Pharmac. Ther* (47):219-231.
 62. Nishikawa M, Tamada A, Hyoudou K, Umeyama Y, Takashashi Y, Kobayashi Y, Kumai H, Ishida E, Staud F, Yabe Y, Takakura Y, Yamashita F, Hashida M (2004) Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice. *Clinical & Experimental Metastasis* (21):213-221.
 63. Kurkucher CM, Wagner U, Kolster B, Andreotti PE, Krebs D y Bruckner HW (1996). Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin and paclitaxel in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Letters* (103):183-189.
 64. Ligh BW, Yu WD, McElwain MC, Russell DM, Trump DL y Johnson CS (1997). Potentiation of cisplatin antitumor activity using a vitamin D analogue in a murine squamous cell carcinoma model system. *Cancer Res.* (57):3759-3759.
 65. Qin XJ, He W, Hai CX, Liang X y Liu R (2008) Protection of multiple antioxidants Chinese herbal medicine on the oxidative stress induced by adriamycin chemotherapy. *Journal of Applied Toxicology* (28):271-282.
 66. Shimpo K, Nagatsu T, Yamada K, Sato T, Niimi H, Shamoto M, Takeuchi T, Umezawa H y Fujita K (1991) Ascorbic acid and adriamycin toxicity. *American J Clin Nutr.* (54):1298S-1301S.
 67. Block K.I, Koch A.C, Mead M.N, Tothy P.K, Newman R.A y Gyllenhaal C (2007) Impact of antioxidant supplement on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Cancer Treatment Reviews* (33):407-418.

CRUCIBIOQ[®] CINÉTICA ENZIMÁTICA

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@bq.unam.mx



HORIZONTALES

- 1** Son las enzimas que tienen como coenzimas a NAD^+ o FAD y que catalizan el desprendimiento de pares de hidrógeno de un sustrato.
- 7** Es un sistema llamado complejo _____, está constituido por un grupo de enzimas que se encuentran relacionadas entre sí y conducen a la formación de un producto.
- 9** Enzima que en su estructura se encuentra presente como grupo prostético un nucleótido de flavina.
- 10** La penicilina inhibe a la transpeptidasa que entrecruza a los peptidoglicanos de la pared bacteriana ya que se fija al centro activo de la enzima y establece una unión con un residuo de serina, de esta manera el antibiótico es un inhibidor _____ de la síntesis de la pared bacteriana y por ende la bacteria no sobrevive.
- 11** La _____ de Michaelis-Menten se observa cuando al graficar la velocidad inicial de una

reacción mediada por una enzima, a medida que aumenta la concentración de sustrato se obtiene una hipérbola

- 12 La alta _____ del proceso enzimático permite que las enzimas reconozcan a sus sustratos debido a la estructura y conformación del centro activo de la enzima para recibirlos.
- 14 El centro activo de una enzima es una región de aproximadamente diez residuos de _____ donde se realiza la unión catalítica enzima-sustrato.
- 15 Cuando en una reacción enzimática se aumenta la _____, aumenta la actividad hasta un máximo, posteriormente ésta decrece abruptamente debido a la desnaturalización proteica; sin embargo, las enzimas de las bacterias termófilas pueden mantenerse activas hasta cerca de 100 °C.
- 16 Enzima que cataliza la fosforilación de la glucosa a partir de ATP en las células, su K_M es de 0.2 mmol/l; los hepatocitos tienen una isoenzima la glucocinasa, cuya K_M es de 10 mmol/l; después de una ingesta alimenticia aumenta la concentración de glucosa sanguínea, que por la acción de esta última isoenzima se fosforila y posteriormente es enviada para formar glucógeno.
- 20 Molécula que cataliza una reacción química específica, aumenta la velocidad de reacción al disminuir la energía de activación.
- 22 Son proteínas con características catalíticas y estructurales similares, pero con diferencias genéticas.
- 23 Figura geométrica que se obtiene al graficar velocidad enzimática contra concentración de sustrato.
- 24 La intoxicación ocasionada por la ingesta de metanol tiene como síntoma inicial la presencia de trastornos visuales; esta sustancia por la acción de la deshidrogenasa alcohólica da lugar a la síntesis de formaldehído y posteriormente a ácido fórmico responsable de la acidosis metabólica; mediante la administración de etanol se puede realizar una _____ competitiva ya que este alcohol tiene mayor afinidad por la enzima.
- 27 Es la estructura proteica de un sistema enzimático, sin la presencia de coenzimas o cofactores.
- 30 Forma en la que las enzimas proteolíticas se sintetizan, si se encontrasen siempre en su forma activa digerirían a los tejidos que las producen.
- 31 El número de _____ de una enzima -llamada también constante catalítica- es el número de procesos que cada sitio activo cataliza por unidad de tiempo.

- 32 Compuesto orgánico indispensable para que algunas enzimas puedan expresar su función catalítica, generalmente participa una vitamina en su estructura.

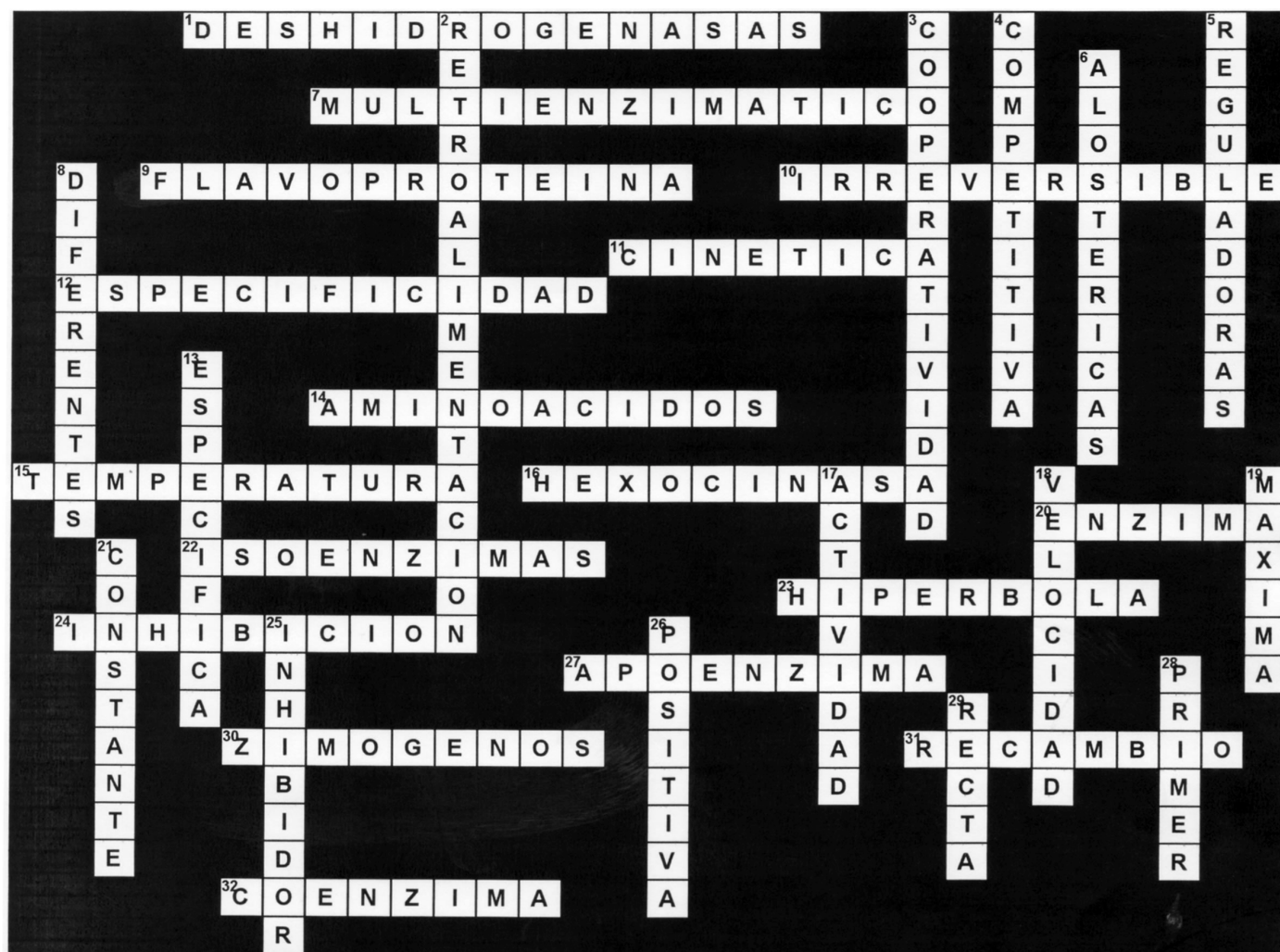
VERTICALES

- 2 Nombre que recibe el proceso cuando en una determinada vía metabólica se acumula un producto, mismo que funciona como inhibidor alostérico, permitiendo que se disminuya la velocidad de la vía, cuando el producto final se va consumiendo y su concentración disminuye, se deja de inhibir la vía.
- 3 Así se llama al fenómeno en el que algunas enzimas tienen varias subunidades y la fijación de un ligando a una de ellas, facilita o dificulta la fijación de otra subunidad, pudiendo ser positiva o negativa.
- 4 Las sustancias que realizan este tipo de inhibición, compiten directamente con el sustrato por el sitio activo de la enzima, generalmente tienen una estructura parecida al sustrato natural, como por ejemplo el malonato que tiene un gran parecido con el sustrato de la deshidrogenasa succínica.
- 5 Las enzimas _____ cumplen esta función, debido a su capacidad de tener un cambio en su actividad catalítica por modificaciones covalentes o por un mecanismo alostérico.
- 6 Este tipo de enzimas tiene varias subunidades y varios sitios activos; la unión de un sustrato a un sitio activo puede modificar las posibilidades de acción de otros sitios con actividad dentro de la misma molécula.
- 8 La constante de Michaelis (K_M) es única para un par enzima-sustrato y cuando _____ sustratos reaccionan con una determinada enzima se obtendrán distintos valores de K_M .
- 13 Nombre que recibe la actividad que mide la pureza de una enzima, y se obtiene a partir de que un número de micromolas de sustrato es transformado por un sistema enzimático por minuto por miligramo de proteína a 25 °C.
- 17 La _____ de una enzima depende críticamente, entre otros factores, del valor de pH en el que se realice la reacción, al graficarse se obtiene una curva con forma de campana, el valor óptimo para las enzimas de origen animal es alrededor de 7.
- 18 La _____ de una reacción enzimática se obtiene al relacionar -ante una determinada enzima- la concentración del sustrato y el tiempo que tarda en obtenerse el producto.

- 19** La velocidad _____ de una reacción enzimática se alcanza a concentraciones altas de sustrato, cuando la enzima se encuentra saturada.
- 21** La _____ de Michaelis indica la afinidad de la enzima por un sustrato y es la concentración de sustrato necesaria para obtener la mitad de la velocidad máxima.
- 25** Cuando en una reacción enzimática participa una sustancia que es un _____ no competitivo, ésta se une tanto a la enzima libre (EI) como al complejo formado por enzima-sustrato (ESI), con ello se distorsiona el sitio activo, lo que conduce a que la enzima sea catalíticamente inactiva.
- 26** Así se llama al fenómeno de cooperatividad en el que algunas enzimas que tienen varias subunidades, cuando se fija un sustrato a una de ellas facilita la fijación a otra subunidad.
- 28** Una reacción enzimática de este orden, es cuando la velocidad de la reacción en cualquier tiempo que se mida, es proporcional a la concentración de sustrato.
- 29** Trazo obtenido por Lineweaver y Burk al graficar las dobles recíprocas en la ecuación de Michaelis-Menten.

SOLUCIÓN AL CRUCIBIOQ[®] CINÉTICA ENZIMÁTICA

Yolanda Saldaña Balmori
Correo E: balmori@bq.unam.mx



INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DE LA REVISTA DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA (REB)

La REB es una revista dedicada a la divulgación, difusión, discusión, análisis y presentación de resultados derivados de investigaciones originales en temas relevantes en el campo de la bioquímica y áreas afines. La Revista está dirigida a investigadores, profesores y estudiantes de posgrado, licenciatura y educación media superior. Los trabajos que se someten a evaluación para su posible publicación no deben de haberse presentado total o parcialmente en otras publicaciones.

Se aceptan únicamente contribuciones originales con estricto contenido científico en forma de artículos de investigación, de revisión, de crítica, de análisis y otras comunicaciones que tengan que ver con diversas formas de estimular el aprendizaje de la bioquímica y sirvan de apoyo a investigadores, profesores y alumnos, tanto en aspectos de investigación, académicos y de actualización.

I. Los artículos se deben ajustar a los siguientes lineamientos editoriales:

- 1) Portada. En el primer párrafo incluir el título, el cual debe de ser claro, simple, atractivo y evitar las abreviaturas o en su caso, definir las al inicio del texto. En el siguiente párrafo se anotarán los nombres completos de los autores, iniciando por el nombre propio completo. La afiliación de los autores se escribirá en el siguiente párrafo, indicando departamento, institución, ciudad, estado y país y la dirección de correo electrónico del autor responsable. La afiliación de los autores se indicará con números entre paréntesis. Se proporcionará un título breve con un máximo de 60 caracteres.
- 2) Resumen. Se deberán incluir dos resúmenes, uno en idioma español y uno en inglés (Abstract) de no más de 350 caracteres.
- 3) Palabras clave. Se deberá proporcionar de tres a seis palabras clave en idioma español y en inglés.
- 4) Texto. El artículo deberá ser escrito en el procesador de textos "Word", con una extensión máxima recomendada de 15 cuartillas a doble espacio, en "Times New Roman 12" como fuente de la letra, sin formato de texto, tabuladores o pies de página. Las figuras y tablas se presentarán separadas del texto.
- 5) Referencias. Se indicarán en el texto con números entre paréntesis de acuerdo a su orden de aparición. Las referencias se enlistarán al final del trabajo y deben contener para los artículos: apellidos e iniciales de todos los autores, año

de publicación entre paréntesis, título completo del artículo y después de un punto, el nombre oficial de la revista abreviado como aparece en el Current Contents, número del volumen y antecedido por dos puntos, el número de la primera y última páginas, de acuerdo con el siguiente ejemplo: Martin GM, Austad SN, Johnson TE (1996) Generic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature Gen* 113:25-34. Los artículos en libros deberán citarse de la siguiente forma: Wood KJ (1992) Tolerance to alloantigens. En: *The Molecular Biology of Immunosuppression*. Editor: Thomson A W. John Wiley and Sons Ltd, Ann Arbor, Michigan, USA, pp 81-104. Los libros podrán incluir las páginas totales o las consultadas y se citarán de acuerdo con este ejemplo: Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1993) *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, NY, USA, p 1013.

- 6) Figuras y Tablas. Las figuras se pueden presentar en formato "jpg" o integradas en un archivo de "Power Point" o del mismo "Word" separadas del texto del artículo. Las figuras pueden presentarse en colores, con fondo y sombreado. Las tablas deben de estar en "Word" sin formatos especiales y separadas del texto del artículo. Las figuras y las tablas se deberán numerar con arábigos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán presentar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja tamaño carta; las letras y números más pequeños no deben ser menores de dos milímetros después de la reducción. En caso de emplear figuras previamente publicadas, deberá darse el crédito correspondiente y en su caso

obtener el permiso para su publicación. Las figuras dentro del texto deberán mencionarse con minúsculas, la palabra entera y sin paréntesis; cuando se haga referencia a ellas deberá citarse con la abreviatura, la primera letra mayúscula y entre paréntesis (Fig. 2). Las tablas siempre llevarán la primera letra a mayúscula y entre paréntesis (Tabla 2).

- 7) Abreviaturas. Las abreviaturas seguirán las normas de la IUPAC, aquellas específicas o poco comunes deberán definirse entre paréntesis, la primera vez que se utilicen.

II. Otras comunicaciones incluyen: resúmenes de artículos científicos interesantes, relevantes o significativos, información científica o académica de interés general, avisos de reuniones académicas y cursos, problemas teóricos, ejercicios prácticos, juegos didácticos con orientación educativa, bolsa de trabajo o comentarios de artículos publicados previamente en la REB, cartas al editor, entre otras. Éstas deberán seguir los siguientes lineamientos:

- 1) El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 2) Se aceptará un máximo de 10 referencias que se citarán entre paréntesis en el texto, como se indica en el inciso I-5. Se podrán incluir figuras o tablas, con las características que se indican en el inciso I-6.

Los manuscritos que no cumplan con las especificaciones de la Revista no serán aceptados de primera instancia para su revisión.

Los manuscritos serán evaluados por lo menos por tres revisores seleccionados por el Comité Editorial a quienes se les enviará el trabajo con los autores en anónimo y quienes en todo momento permanecerán anónimos para los autores y entre

ellos; los revisores opinarán sobre la relevancia del trabajo en un lapso no mayor a un mes. Las correcciones y sugerencias de los revisores serán enviadas con anonimato entre ellos al Editor en Jefe. El resultado de la evaluación puede ser: rechazado, enviado para correcciones o aceptado. Una vez obtenida una evaluación global, el Editor en Jefe enviará las evaluaciones al autor responsable para que corrija e incorpore en el manuscrito las diferentes observaciones o en su caso, indique su opinión a observaciones que considere discutibles en los dictámenes de los revisores. El manuscrito corregido por los autores deberá ser devuelto a la Revista, en un lapso no mayor a 30 días naturales; de otra forma se considerará como un manuscrito enviado por primera vez. De ser necesario el Comité Editorial podrá enviar nuevamente el manuscrito corregido a los revisores para tener una nueva ronda de revisión, todo ello continuando con el anonimato. Una vez aceptado el trabajo, las pruebas de galera, se enviarán al autor responsable.

Los archivos electrónicos se deberán enviar a la Revista de Educación Bioquímica como archivos adjuntos (reb@bq.unam.mx), con atención al Editor en Jefe y a partir de una dirección de correo electrónico que será considerada como la dirección oficial para la comunicación con los autores. El autor responsable deberá indicar plenamente su adscripción con teléfono, dirección electrónica y postal para comunicaciones posteriores. En el texto del mensaje enviado se deberá expresar la solicitud para considerar la posible publicación del artículo, el título del mismo, los nombres completos de los autores y su adscripción institucional, así como el número, tipo y nombre de los archivos electrónicos enviados. En el mismo texto se debe de aclarar que el trabajo no ha sido enviado a otra revista en su forma total o parcial, para su evaluación o que el mismo está en proceso de publicación en otra revista o en otro tipo de publicación. De igual manera se debe de aclarar que no existe conflicto de intereses entre los autores que envían el trabajo.