



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

“ así todos los problemas clásicos de la biología molecular han sido resueltos, o se resolverán, en los próximos diez años”, escribió Sydney Brenner en una carta de 1963 a su jefe Max Perutz, el por entonces jefe del Laboratorio de Biología Molecular en Cambridge, Inglaterra. Y continuó: “Creo que el futuro de la biología molecular está en ampliar la investigación a otras áreas, especialmente, el de la biología del desarrollo”.

que este chiquitín de un 1 milímetro podría dar respuestas a preguntas fundamentales sobre el desarrollo de un organismo; tal vez incluso el de los seres humanos.

En 1969 John Sulston se unió al grupo de investigación dirigido por Sydney Brenner. Junto con el norteamericano Robert Horvitz, pasaba horas frente al microscopio viendo crecer a cientos de gusanos. Los dos cien-

En humanos el gusano está adentro

Lo que un pequeño nematodo devela sobre nuestros genes

Los trabajos más importantes en la duplicación del ADN (replicación), y su copiado al correspondiente ARN mensajero (transcripción), se llevaron a cabo en la década de 1950 en bacterias y virus. Brenner estaba en la búsqueda de un objeto de investigación que se pudiera manipular con la misma facilidad. En eso, el por entonces joven de 35 años se topó con el **nematodo *Caenorhabditis elegans***. “Necesitamos un organismo multicelular con un corto tiempo de duplicación, que sea fácil de conservar y lo suficientemente pequeño como para reproducirse en gran número, como un microorganismo. Debe tener relativamente pocas células para poder hacer estudios detallados de **líneas celulares** y patrones de división, y ser accesible para análisis genéticos”.

El adulto de *C. elegans* tiene efectivamente 959 células fáciles de visualizar. Normalmente vive en el suelo alimentándose de microorganismos. En el laboratorio, los investigadores lo crían sobre una placa de agar sembrada con la bacteria *E. coli*. Este hermafrodita se autofertiliza y en el curso de su vida, que dura sólo dos o tres semanas, pone unos 400 huevos. Demora cerca de medio día (a 25°C) para que a partir de un huevo fecundado se desarrolle una larva, y unas 40 horas más, para que el animal alcance la madurez. Debido a que huevos y larvas son transparentes, se puede ver cada célula y seguir sus divisiones en vivo y en directo bajo un microscopio. Los investigadores sospecharon

tíficos documentaron minuciosamente cada línea celular mediante dibujos a mano alzada (en la actualidad, las divisiones celulares son grabadas con una cámara computarizada montada sobre un microscopio 4D, y las líneas celulares son capturadas semiautomáticamente mediante el *software* correspondiente). Finalmente, se obtuvo un árbol filogenético que describe el origen de cada célula del gusano.

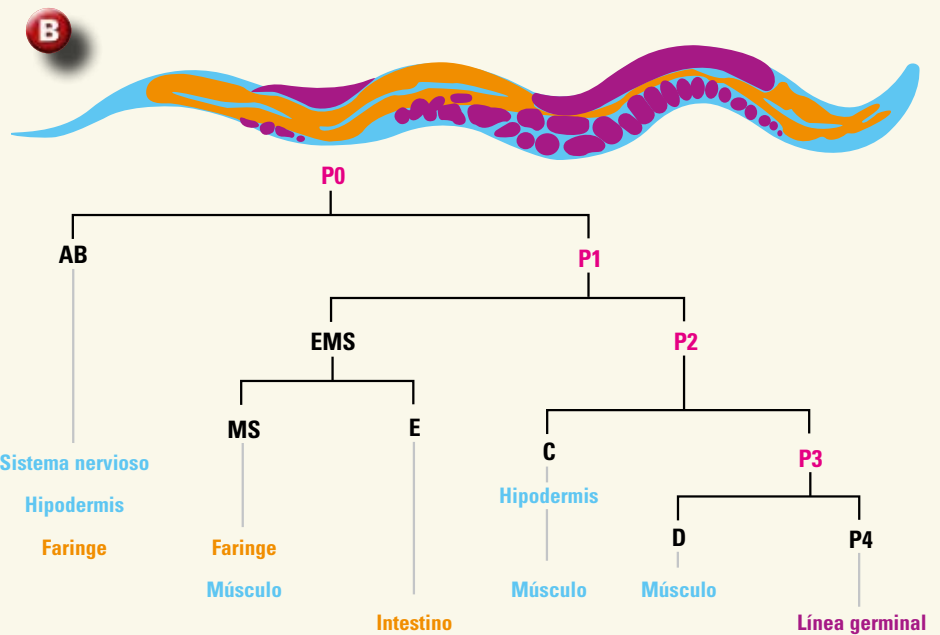
→



A

► Micrografía electrónica del nematodo del suelo *Caenorhabditis elegans* con un tamaño de 1mm.

► **Árbol filogenético temprano de líneas celulares en *C. elegans*.** Durante las primeras cuatro divisiones, las células P forman las células somáticas fundacionales que luego dan lugar a diferentes tejidos del embrión.



→ El desarrollo está tan predeterminado, que después de las primeras **divisiones celulares** se puede predecir desde cuál de las dos, cuatro u ocho células se desarrollan, por ejemplo, el tracto digestivo o los órganos reproductivos. Los biólogos desarrollistas llaman a este fenómeno **constancia celular**.

La **embriogénesis (Fig. B)** comienza con una división asimétrica del óvulo fecundado, el cigoto (P0). En ese momento se genera la denominada célula base (AB), de la que más tarde derivan células epidérmicas, células nerviosas y partes del tracto digestivo. Las células P (P1, P2, P3), similares a células madre, durante las siguientes divisiones asimétricas, formarán las células base de músculos y faringe (MS), intestino (E), así como de piel y músculos (C y D). La P4, la última de las células de tipo P, es la precursora de la línea germinal. En este estadio, el embrión ya tiene 24 células y la gastrulación comienza. Éstas continúan dividiéndose, de

modo que al eclosionar, la larva posee exactamente 558 células (**Fig. C**). Por último, en el gusano adulto se crean 330 células que forman un tubo epidérmico y muscular que contiene unas 300 neuronas, alrededor de 140 células del tracto digestivo y 140 células de los órganos genitales.

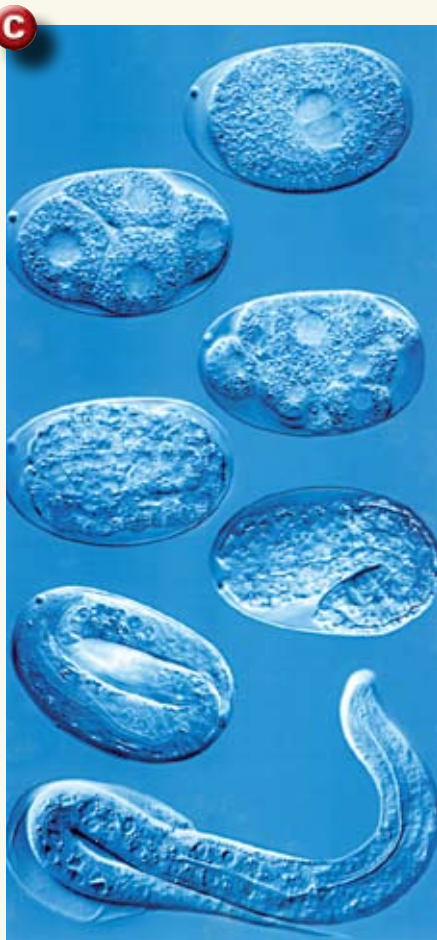
CÉLULAS DESACTIVADAS

Durante este proceso de desarrollo, 131 células se eliminan del embrión mediante un programa de "suicidio" controlado genéticamente; la **muerte celular programada** (apoptosis). El término griego "apoptosis" se refiere a la caída de las hojas en otoño y se aplica muy bien, si bien en este caso describe la muerte de células individuales en beneficio de todo el organismo. Este mecanismo, que fue descrito por primera vez en el nematodo, también está presente en los seres humanos: para lograr un equilibrio entre las miles de millones de células nuevas que se generan a diario en nuestro cuerpo, otras células deben morir de manera constante y regulada. Si no lo hacen, se genera un crecimiento descontrolado, no balanceado de células: el cáncer. Además, la muerte celular programada asegura que las del sistema inmune tengan una vida útil limitada. De otro modo, las que, por ejemplo, combaten una

gripe, continuarían produciendo sus toxinas defensivas incluso después de la infección. La muerte celular asegura que junto con la enfermedad se termine el "rearme".

Sin embargo, la pregunta central que los científicos se hacían era: ¿qué genes controlan el programa de la división celular de un ser vivo? ¿Porqué a partir de una sola célula, el óvulo, en un caso se forma un gusano con 959 células, y en el otro, un hombre con 100.000.000.000.000 (cien billones) de células? En 1998 el grupo de trabajo de John Sulston logró descifrar el genoma de *C. elegans*. De esta forma, por primera vez, los investigadores tuvieron en sus manos el mapa genético completo de un animal. La decodificación de las cien millones de letras del genoma del gusano fue también la prueba de ensayo para la decodificación del genoma humano, 30 veces más grande. Por su trabajo, en 2002 Brenner, Sulston y Horvitz recibieron el Premio Nobel de Medicina. "Cómo los genes determinan las complejas estructuras en los organismos superiores, es un problema sin resolver en la biología", escribió en 1974 Sydney Brenner en un tratado sobre "la genética de *Caenorhabditis elegans*". En su discurso durante la ceremonia de los Premios Nobel señaló que, 30 años después, esto sigue siendo el caso.

◀ **Presentación en microscopía óptica de la embriogénesis de *C. elegans*.** Se muestran siete estadios: desde el cigoto (arriba) pasando por la fase de 4 y 12 células, la fase de "frijol" (centro) en la que están presentes las 558 células del embrión, hasta la morfogénesis. La larva emerge del huevo, que posee un tamaño aproximado de una vigésima parte de un milímetro.



El Director del Instituto Max Planck de Biología Celular Molecular y Genética de Dresde quiere saber qué pasa en los primeros momentos de vida, cuando se genera un organismo multicelular. "El gran desafío de la era post-genómica es determinar las funciones de genes individuales y sus complejas relaciones", dice el biólogo celular. Es que sólo con el genoma no se puede hacer mucho, "a pesar de que se puede imprimir en forma de letras, aún no entendemos la gramática de este gigantesco texto".

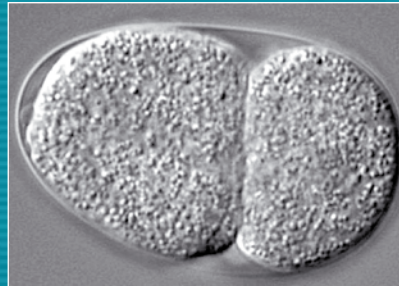
GENES SILENCIADOS

¿Cuáles de los más de 19.000 genes controlan los primeros ciclos de división celular en *C. elegans*? Para averiguarlo, en última instancia, todos los genes deben ser puestos a prueba para determinar su posible contribución durante las dos primeras divisiones celulares después de la fecundación. Por lo tanto, Hyman y sus colegas decidieron desactivar un gen diferente en cada uno de los 19.000 experimentos, y registrar el desarrollo del embrión con una cámara conectada al microscopio durante media hora (que es el tiempo que demora en llegar al estadio de cuatro células). Dado que para cada gen fueron examinados varios embriones, se generó un total de 40.000 filmaciones que los científicos analizaron de acuerdo a criterios específicos: éstos incluyen el tamaño del huevo y su forma, el flujo citoplasmático, el número y la migración de los pronúcleos, la estructura y posición del huso mitótico, la disposición de los polos del huso, la formación del surco de división celular, tamaño y forma de los núcleos en células hijas, etc. El catálogo de los científicos incluía un total de 45 criterios diferentes (<http://www.worm.mpi-cbg.de/phenobank2/cgibin/DefectMapPage.py>).

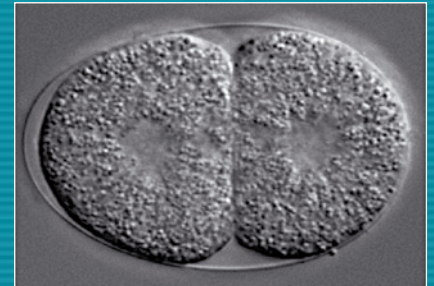
Pero ¿cómo hacen los biólogos celulares para lograr desactivar genes en forma selectiva? Normalmente, cuando se debe producir

D

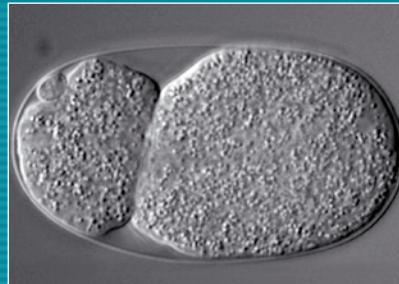
Espécimen silvestre



Par-6 (ARNi)



Dineína (ARNi)

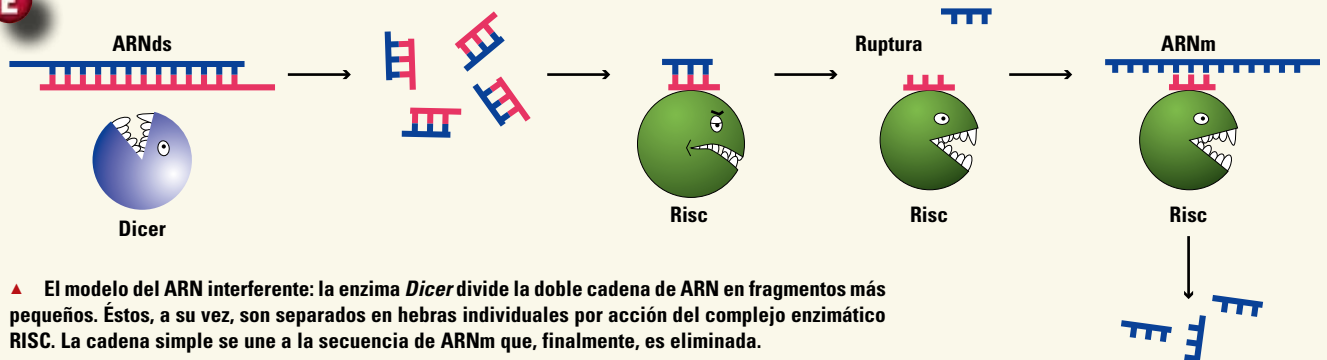


La división celular en la célula del espécimen silvestre (arriba izquierda) es asimétrica, es decir, la célula fundadora AB es mayor que la célula P. A través de ARNi, se desactiva un gen (Par-6), que conduce a una división celular simétrica (se crean dos células hijas de igual tamaño). En cambio, cuando se silencia el gen *dineína*, se ejecuta la división asimétrica (izquierda), pero se invierte el sentido, resultando la célula fundadora AB de un menor tamaño que la célula P.

una proteína en particular, inicialmente en el núcleo se genera una copia del gen correspondiente. Este proceso se denomina transcripción y en él se genera un **ARN mensajero (ARNm)** de una sola cadena homóloga con una secuencia de bases contraria. Este ARNm viaja a las fábricas de proteína de la célula, los ribosomas, donde es leído y siguiendo sus instrucciones, se forman las proteínas. A fines de la década de 1980 ya se había observado que, en plantas, los ARNm pueden ser interceptados (apenas previo a ser leídos) por medio de un fragmento simple de ARN homólogo: esta cadena simple de *ARNm antisentido* se acopla al ARNm correspondiente formando una doble cadena sin función alguna. La proteína ya no puede ser producida, y el gen es cuasi silenciado. Por eso, los investigadores hablan de silenciamiento génico.

Los estadounidenses Andrew Fire y Craig Mello descubrieron que este silenciamiento génico, también conocido como **ARN interferente (ARNi)**, no es una rareza en el metabolismo de las células de las plantas, sino un mecanismo fundamental en la regulación de los genes. Por este descubrimiento, en 2006 fueron distinguidos con el Premio Nobel de Medicina. Y de nuevo fue el pequeño gusano de laboratorio *C. elegans* el que ayudó a los investigadores a continuar: en él fue que Craig y Mello pudieron demostrar que no son los fragmentos de ARN de cadenas simples sino los de cadenas dobles los que bloquean las secuencias de ARNm homólogas en células del gusano (**Fig. E**). Una trituradora celular, la enzima *Dicer*, corta la **molécula de ARN bicatenaria** en pequeños fragmentos de unos 20 nucleótidos. Estos fragmentos son absorbidos por un complejo →

E



▲ El modelo del ARN interferente: la enzima *Dicer* divide la doble cadena de ARN en fragmentos más pequeños. Éstos, a su vez, son separados en hebras individuales por acción del complejo enzimático RISC. La cadena simple se une a la secuencia de ARNm que, finalmente, es eliminada.

¿QUÉ HAY DE NUEVO SOBRE EL ARN?

Si nos centramos en el número de resultados en Google, vemos que el ADN es por lo menos cuatro veces más importante que el ARN. Pero eso podría cambiar en el futuro. El 1,5% de los tres mil millones de letras del genoma humano codifican para estructuras de proteínas. El restante 98,5% hasta hace poco era designado como "ADN basura" porque presuntamente no poseía función. Nadie sabía lo que esas letras significaban. Investigaciones recientes, sin embargo, sugieren que estos fragmentos de ADN codifican para moléculas de ARN que cumplen múltiples funciones de regulación.

Podría deberse a esta red de señales de ARN que la persona alcance una complejidad estructural mucho mayor que, por ejemplo, el nematodo – porque con unos 20.000 a 25.000 genes, no tenemos en realidad muchos más que *Caenorhabditis elegans*. Por el contrario, es precisamente la proporción de las secuencias que no codifican para proteínas la que crece con la complejidad de los organismos. En estas secuencias deben estar contenidos los detalles arquitectónicos que aseguran que un óvulo fertilizado no devenga en un gusano, sino en un macho como Arnold Schwarzenegger.

→ de diferentes enzimas (RISC), que los dividen en cadenas simples y los acoplan al ARN mensajero correspondiente. La doble cadena disfuncional finalmente es desintegrada por la célula.

Para activar el ARN interferente, incluso alcanza con unas pocas moléculas de ARN. Es decir que cada vez que un nuevo ARN es dividido por el complejo enzimático, este último se regenera con una molécula corta de ARN, por lo que ésta, que inicialmente era de cadena doble, puede destruir catalíticamente muchos ARNs complementarios. Por otra parte, los fragmentos de ARN generados en la división se pueden duplicar en la célula mediante otras enzimas. Esta multiplicación asegura que el ARN interferente, una vez iniciado, pueda seguir actuando incluso cuando el ARN desencadenante fue degradado. Así, por ejemplo, las células hijas pueden continuar con la interferencia del ARN que se inició en la célula madre.

Como instrumento de investigación, la técnica de ARNi es un éxito rotundo: con ella, los científicos pueden suprimir la expresión de cualquier gen en organismos modelo tan diversos como plantas, gusanos y moscas, obteniendo así información acerca de su función. Anthony Hyman y sus colaboradores sólo tuvieron que producir el ARN de doble hélice para cada uno de los 19.000 genes del nematodo, e inyectarlos en las células germinales del gusano adulto. Los embriones resultantes de la fecundación fueron examinados por los investigadores bajo el microscopio óptico con un arreglo específico (contraste de interferencia diferencial - DIC, por su sigla en inglés), que proporciona una representación espacial de las células, lo que permite ver al embrión del gusano con detalle en las primeras divisiones celulares (Fig. D).

El resultado del análisis: 661 de los 19.000 genes influyen en el desarrollo del embrión temprano de *Caenorhabditis elegans*. Cerca de la mitad de estos genes están involucrados en procesos de división celular, tales como la distribución de los cromosomas o la citocinesis. La otra mitad son necesarios para mantener los procesos básicos de la vida de la célula, como la traducción (la conversión del ARNm en una secuencia específica de aminoácidos), o la labor de la mitocondria. Los investigadores también pudieron asignar una tarea a genes del nematodo previamente desconocidos: siete de estos genes controlan la función de los cromosomas, tres estructuran la envoltura nuclear, cuatro conducen el ciclo de división celular, y once coordinan el metabolismo celular con el combustible ATP. Para 17 de los nuevos genes, los biólogos moleculares también pudieron confirmar la misma función en los seres humanos.

NEMATODO DE PRUEBA

Precisamente ésta es la razón por la cual los científicos se ocupan de este pequeño nematodo: las vías de señalización celular son, con pocas excepciones, muy similares en los gusanos y los seres humanos. Para más de un 60% de los **genes de enfermedades** actualmente conocidos en humanos, se encontraron genes homólogos en el genoma del *C. elegans*. Así, fueron identificados en el nematodo prácticamente todos los genes encontrados en los últimos años, para los cuales existe una relación causal con la enfermedad de Alzheimer. Con la supresión de los genes que determinan la predisposición a la enfermedad de Alzheimer en humanos, *C. elegans* pierde la capacidad para poner sus huevos. Si se reintroducen estos genes al gusano, se puede corregir este defecto, lo que en principio no sorprende. Sorprendente, sin embargo, es la observación de que el defecto

puede ser eliminado mediante la inserción de las variantes de genes humanos. Por lo tanto, éstos son también completamente funcionales en el genoma del gusano, aunque fue hace unos 200 millones de años que los seres humanos y los gusanos tuvieron un ancestro común. Evidentemente, algunos genes mantienen sus funciones durante millones de años cuando son importantes para el mantenimiento de la vida.

El estudio del desarrollo de **organismos modelo** es un comienzo prometedor en la búsqueda de medicamentos contra enfermedades específicas. Por eso, los investigadores del grupo de Anthony Hyman trabajan en estrecha colaboración con la compañía de biotecnología Cenix BioScience radicada en Dresde. A través del sistemático *silenciamiento del RNAi* esperan poder rastrear los genes que necesariamente deben ser activados en células cancerígenas y no en células normales (los genes que están involucrados en los procesos de división celular, son de especial interés). Así pues, existiría la posibilidad de desarrollar un fármaco que podría inhibir la función de la proteína correspondiente y por lo tanto ser adecuado como medicamento contra el cáncer. El ARN interferente posiblemente también pueda ser utilizado para esto mismo; por lo menos su potencial terapéutico se considera elevado. Sin embargo, a pesar de resultados alentadores en algunos laboratorios, puede tardar un tiempo hasta que los tratamientos basados en ARNi sean aplicables en seres humanos.

PIE DE IMPRENTA

Sociedad Max-Planck, Departamento de Información y Relaciones Públicas, Hofgartenstraße 8, 80539 München / e-mail: presse@gv.mpg.de

Redacción y texto: Dra. Christina Beck

Traducción: Ing. Agr. Roberto Neuwald

Diseño: www.haak-nakat.de

La versión en español se hizo con el apoyo del DAAD y con fondos del Ministerio de Relaciones Exteriores de Alemania.



SIEMENS

DAAD

Deutscher Akademischer Austausch Dienst
Servicio Alemán de Intercambio Académico

BASF
The Chemical Company



200 AÑOS
BICENTENARIO
ARGENTINO



Ministerio de
Ciencia, Tecnología
e Innovación Productiva
Presidencia de la Nación