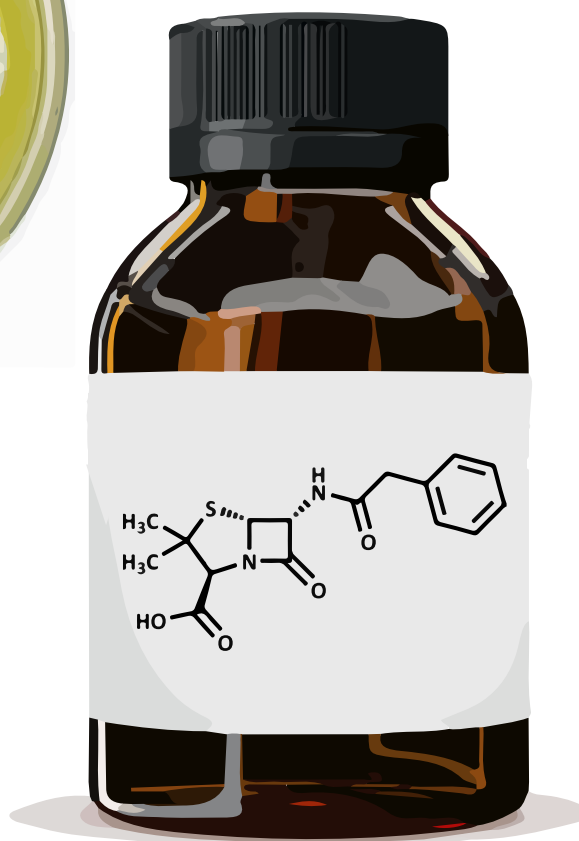
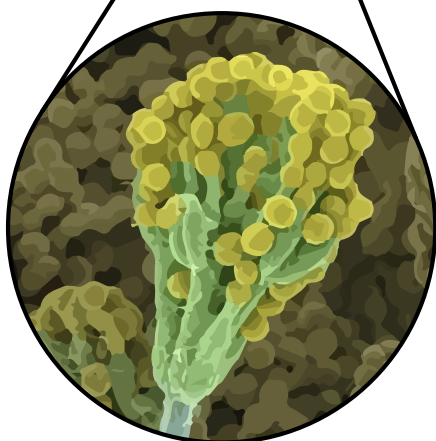
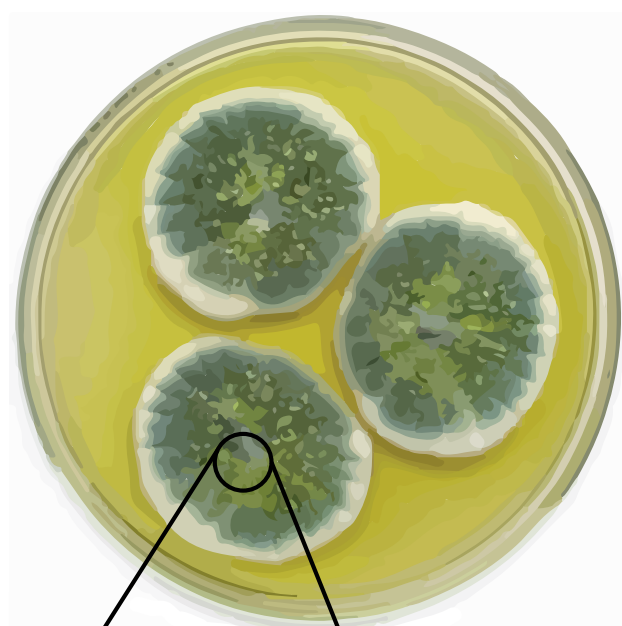


Encuentros en la **b**iología



Antibióticos
Más que armas defensivas y de
ataque

**Normalización de la
RT-qPCR**

Enfermedades raras
con angiogénesis desregulada

ENCUENTROS EN LA BIOLOGÍA
Revista de divulgación científica
Indexada en *Dialnet*

Periodicidad:
4 números ordinarios (trimestrales) y al menos
1 número extraordinario monográfico al año

Entidad editora:
Universidad de Málaga
EDITADA SIN FINANCIACIÓN INSTITUCIONAL, PÚBLICA
NI PRIVADA

Correspondencia a:
José M^a Blanco
Departamento de Ecología
Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
29071 - Málaga
encuentrosenlabiologia@uma.es

Depósito legal: MA-1.133/94
ISSN (versión electrónica): 2254-0296
ISSN (versión impresa): 1134-8496

EQUIPO EDITORIAL

COEDITORES

- Héctor Valverde Pareja
hvalverde@uma.es
Biología evolutiva
molecular
*Gestión de
infraestructuras,
editoriales,
maquetación.*
- José M^a Blanco Martín
jmblanco@uma.es
Ecología
*Coordinación general,
editoriales, la imagen
comentada.*

COMITÉ EDITORIAL EJECUTIVO

- Ana Grande
agrande@uma.es
Genética-virología,
Patogénesis virales.
Jóvenes científicos.
- Antonio Diéguez
dieguez@uma.es
Filosofía de la ciencia
A debate, reseñaciones.
- Carmen González
carmen.glez@uma.es
Información y
documentación
Calidad y difusión.
- Enrique Moreno Ostos
quique@uma.es
Ecología y limnología
Encontronazos.
- Enrique Viguera
eviguera@uma.es
Genética y genómica
Eventos especiales.
- Francisco José Villena
francis.villena@uma.es
Jóvenes científicos.
- José Carlos Dávila
davila@uma.es

Biología celular y
neurobiología
¿Cómo funciona?

- José Lozano
jlozano@uma.es
Señalización Celular y
Cáncer
- José M^a Pérez Pomares
jmperezp@uma.es
Biología del desarrollo y
cardiovascular
Entrevistas.
- Juan A. García Ranea
ranea@uma.es
Bioinformática y
biología de sistemas
Modelos en biología.
- Juan A. Pérez Claros
johnny@uma.es
Paleontología
*Encuentros con las
novedades.*
- Juan Carlos Aledo
caledo@uma.es
Bioquímica y biología
molecular
*Energética de procesos
biológicos, vida y obra.*
- Juan Carlos Codina
jccodina@uma.es
Microbiología,
educación secundaria
Ciencias en el bachillerato.
- Laura Vidal López
lvidal@grafitto.es
Administración de
sistemas
*Maquetación, difusión y
calidad.*
- Luis Rodríguez Caso
caso@eelm.csic.es
Técnicas de laboratorio
Calidad y difusión.
- Miguel A. Medina
Torres
medina@uma.es
Biología molecular y de

sistemas, biofísica y
bioquímica
Monitor.

- Ramón Muñoz-Chápuli
chapuli@uma.es
Biología del desarrollo y
cardiovascular
*Coordinación de la
edición electrónica,
foros de la ciencia.*
 - Raúl Montañez
Martínez
raulmm@gmail.com
Biología sintética y de
sistemas
Coordinación de diseño.
- ### COMITÉ EDITORIAL ASOCIADO
- Alberto Martínez
almarvi@wanadoo.es
Educación ambiental y
para el empleo.
 - Alejandro Pérez García
aperez@uma.es
Microbiología,
interacción
planta-patógeno.
 - Alicia Rivera
arivera@uma.es
Neurobiología y
enfermedades
neurodegenerativas.
 - Beatriz Martínez
Poveda
bmpoveda@uma.es
Biología molecular del
cáncer y enfermedades
cardiovasculares.
 - Félix López Figueroa
felix_lopez@uma.es
Ecología y fotobiología,
cambio climático.
 - Francisco Cánovas
canovas@uma.es
Fisiología molecular
vegetal, bioquímica y
biología molecular.
 - Jesús Olivero

jesusolivero@uma.es
Zoogeografía y
biodiversidad animal.

- Juan Antonio Guadix
Domínguez
jaguadix@uma.es
Desarrollo embrionario,
diferenciación celular y
biología de células
madre.
- Margarita Pérez Martín
marper@uma.es
Fisiología animal,
neurogénesis.
- M^a del Carmen Alonso
mdalonso@uma.es
Microbiología de aguas,
patología vírica de
peces.
- M^a Jesús García
Sánchez
mjgs@uma.es
Fisiología vegetal,
nutrición mineral.
- María Jesús Perlés
mjperles@uma.es
Geomorfología, riesgos
medioambientales.
- M. Gonzalo Claros
claros@uma.es
Bioquímica, biología
molecular y
bioinformática.
- Raquel Carmona
rcarmona@uma.es
Ecofisiología,
biorremediación.
- Reinald Pamplona
reinald.pamplona@mex.udl.cat
Fisiología, medicina
experimental.
- Salvador Guirado
guirado@uma.es
Biología celular,
neurobiología.



Índice

Editorial	204
La imagen comentada	205
Antibióticos	206
Jóvenes científicos	209
Normalización de la RT-qPCR	212
Escribir bien	215
Un caudaloso río de carbono	217
Enfermedades raras y angiogénesis	220
«La bala mágica»	223
Encuentros con las novedades	226

Editorial

De empleo divulgador

Carl Sagan, George Gamow, Stephen Jay Gould, Lynn Margulis, Richard Dawkins y unos pocos más, pero pocos, excelentes científicos y mejores divulgadores de la ciencia. Rayas en el agua. Un gremio que alardea de un método de trabajo diáfano, cuando llega la hora de *contárselo a la abuela*, peca de un oscurantismo narcótico capaz de tumbar al oyente más entusiasta; el «esta persona debe de saber mucho, pero no hay quién la entienda» es irrazonablemente común en el mundo científico. Algunos parece, incluso, que lo hagan a conciencia porque, sin querer, ¡es imposible explicarse tan mal!

Esta carencia de empatía, tópico merecido del científico común, es un lastre que no sólo obstaculiza el desarrollo de la ciencia (¿cómo convences a alguien que no te entiende para que te dé dinero?), sino que la desviste de su responsabilidad social más importante: despertar potenciales ocultos en la educación tradicional. El sistema educativo más generalizado en todos sitios (incluso aquí) se basa en una producción de graduados en serie que inhibe cualquier atisbo de genialidad. A lo peor es que no hay otra manera pero, aún así, está comprobado que algún alumno que otro se salva. ¿Quién ha sido el responsable? Un maestro instigador, una profesora ilusionada, un abuelo imbatido, un libro

oportuno, una serie de televisión o una juntera propicia de bar. O sea, de chiripa. Es demasiado peligroso dejar en manos de la providencia esta repesca de potenciales pero, visto el percal, más peligroso aún es dejarla en manos de científicos *avanzados*.

Isaac Asimov, Martin Gardner, Ian Stewart, Felipe Mellizo, Manuel Toharia y muchos más, pero muchos, no apabullan con sus *índices h* pero han pregonado la ciencia de forma irresistible. No han sido nobeles pero seguro que muchos nobeles les deben su impronta a unos paladines anónimos de la ciencia. Seguramente, muchos logros científicos no habrían sido posibles si el autor no hubiera despertado científicamente gracias a estos divulgadores. Antes malpagados tenían su premio en la satisfacción filantrópica de balde, pero cada vez menos: muchos periódicos buenos, incluso universidades y centros de investigación, tienen sus *expertos comunicadores*. Aunque no es exactamente lo mismo, algo se parece y ya se empieza a abrir un nuevo tipo de empleo.

Ayer nos visitaron unos alumnos de ciencias ambientales que han creado una web de divulgación científica. Una iniciativa sorprendente para una persona que busca su primer trabajo. ¿O no?

La imagen comentada



FLORECE POR PRIMERA VEZ EN ESPAÑA UN EJEMPLAR DE LA «FLOR CADÁVER»

Su nombre científico es *Amorphophallus titanum*, pero se la conoce popularmente por el merecido título de «flor cadáver» por el olor de algunas de las sustancias que emanan de su inflorescencia como: la trimetilamina (similar al olor a pescado podrido), el indol (semejante a olores fecales) y el ácido isovalérico (típico del mal olor de pies)^[1]. Pese a tales escatológicos atributos de los que se sirve para atraer a posibles insectos polinizadores, sus flores gozan de ser reconocidas como las más grandes del mundo, pudiendo llegar a alcanzar el metro de diámetro y los tres de altura. Además, sólo existe constancia de unas 40 floraciones en jardines botánicos, lo cual los convierte en fenómenos altamente excepcionales. Países como Alemania, Holanda, Lon-

dres o los EE. UU. son algunos en los que ha sido posible cultivar este espectáculo de la naturaleza, a los que ahora se une España desde el 13 de Marzo de 2017 con este espécimen fotografiado en el Parque Botánico-Orquidario de Estepona (Málaga). Sin duda una gran lástima que su proceso de floración no supere las 72 horas.

Referencias

¹Geoffrey C. Kite, Wilbert L.A. Hettterschied, [Inflorescence odours of *Amorphophallus* and *Pseudodracontium* \(Araceae\)](#), *Phytochemistry*, Volume 46, Issue 1, September 1997, Pages 71-75, ISSN 0031-9422.

ANTIBIÓTICOS, ALGO MÁS QUE ARMAS DEFENSIVAS Y DE ATAQUE ANTIBIOTICS, SOMETHING MORE THAN DEFENSIVE AND OFFENSIVE WEAPONS

por JUAN CARLOS CODINA ESCOBAR

COLABORADOR HONORARIO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UMA. PROFESOR DE EESS EN EL IES
SIERRA BERMEJA, AVENIDA RAMÓN Y CAJAL, 113. 29014-MÁLAGA.

jccodina@uma.es

Palabras clave: antibiótico, hormesis, biopelícula, fitness ecológico
Keywords: antibiotics, hormesis, biofilms, ecological fitness

Enviado: 29 de diciembre de 2016
Aceptado: 21 de febrero de 2017

El descubrimiento de los antibióticos abrió una nueva era en la medicina al reducir las muertes por infecciones. Pero, además, los antibióticos actúan en el ambiente mejorando la eficacia biológica de la bacteria que los produce. Ejercen varios efectos a concentraciones por debajo de la inhibitoria, actuando en un proceso de hormesis, es decir, desencadenando distintas respuestas en función de la concentración. Estas respuestas incluyen la formación de biopelículas, la movilidad bacteriana y las funciones nutricionales. Estos nuevos descubrimientos deben cambiar la visión antropocéntrica que tenemos de los antibióticos.

The discovery of antibiotics opened a new era in therapeutics reducing the number of people dead by infections. But antibiotics play other roles in the environment that enable the bacteria that produce them to increase their ecological fitness. Antibiotics exert different effects at concentrations below the inhibitory level playing a role in the hormesis process, that is, the ability of metabolites to induce different responses depending on its concentration. These responses range from production of biofilms to bacterial motility or nutritional functions. So, our human point of view of antibiotics should change.

En el año 1928, en el hospital St. Mary de Londres, Alexander Fleming descubrió la producción de la penicilina por parte del hongo *Penicillium notatum* y su actividad antibacteriana. Este descubrimiento fue el punto de partida para la introducción en el medio clínico de los antibióticos que redujeron en gran medida el número de muertes causadas por infecciones. Howard W. Florey de la Universidad de Oxford, en colaboración con Ernst Chain, Norman G. Heatley y Edward P. Abraham, lograron con éxito que la penicilina pasase de ser una sustancia estudiada en el laboratorio a ser usada como tratamiento clínico en 1941. La producción de penicilina a gran escala se llevó a cabo en los Estados Unidos durante el período de la Segunda Guerra Mundial, por parte de científicos e ingenieros del *Northern Regional Research Laboratory* del Departamento de Agricultura de los EEUU, los laboratorios Abbot, los laboratorios Lederle, Merck & Co. Inc., Chas Pfizer & Co. Inc. y E.R. Squibs & Sons. Esto abrió la era de los antibióticos, reconocida como uno de los grandes avances en terapéutica.

Pero, ¿qué son y para qué sirven los antibióticos más allá del uso que hacemos de ellos desde el punto de vista humano? Los antibióticos engloban a un grupo químicamente heterogéneo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por microorganismos, que tienen efectos deletéreos sobre el crecimiento o las actividades metabólicas de

otros microorganismos^[1]. Los ambientes representados por el suelo y los asociados a plantas, contienen numerosas bacterias que producen metabolitos específicos con actividades específicas o de amplio espectro frente a otros microorganismos con los que coexisten. Por ello, si los organismos productores de antibióticos pudiesen definirlos irían más allá de esta visión histórica de los mismos como componentes principales del armamento de la lucha microbiana en sus respectivos ecosistemas.

Existen muchos procesos modulados por antibióticos que pueden ser críticos para la bacterias productoras de los mismos, como puede ser el caso de la adquisición de sustratos o el inicio de cambios en el desarrollo que aseguren su supervivencia bajo condiciones de estrés. Los antibióticos existen mucho antes que la especie humana, habiéndose datado en el período cámbrico su primera producción; e incluso se ha propuesto que moléculas parecidas a los antibióticos jugaron un papel importante en los inicios de la evolución bioquímica, como efectores o catalizadores en una variedad de reacciones de condensación tales como la transcripción y la traducción^[2]. Así pues, y sobre la base del número limitado de ejemplos de la función ataque/defensa de los antibióticos, en los ambientes naturales, deberíamos coincidir con Monier^[3] en su afirmación de que nuestra visión antropogénica de los antibióticos en el ambiente clínico no debería ser extrapolable al ambiente nativo de los

microorganismos productores. El hallazgo de que los antibióticos ejercen efectos variados sobre los microorganismos a concentraciones por debajo del nivel inhibitorio hacen patente el papel de los mismos en el fenómeno de hormesis, es decir, la capacidad de metabolitos de inducir respuestas diferentes dependiendo de su concentración. Por consiguiente, no es de extrañar que se haya sugerido que los antibióticos llevan a cabo su función de una manera dependiente de su concentración, actuando como inhibidores a altas concentraciones y como mediadores en procesos de señalización intercelular a bajas concentraciones^[4].

Entre las funciones potenciales de los antibióticos en la naturaleza, la primera es la más obvia, como mecanismo de defensa y ataque. En su medio ambiente natural, los organismos productores de antibióticos, entre ellos las bacterias están expuestos a una amplia gama de agentes depredadores, entre ellos nemátodos y protozoos. Muchos géneros bacterianos que incluyen a *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* producen una gran variedad de péptidos sintetizados por vía no ribosomal con efecto antibiótico. Entre ellos, los lipopéptidos producen disgregación de las membranas celulares con la consiguiente lisis de diferentes estructuras como las zoosporas de oomicetos o los trofozoítos de algunos flagelados. A veces, algunos lipopéptidos son empleados como señales de advertencia para determinados nemátodos bacteriófagos. Es el caso de la interacción entre la bacteria *Serratia marcescens* y el nematodo *Caenorhabditis elegans*. *Serratia* produce el lipopéptido serrawetina W2. Se ha comprobado en ensayos *in vitro* que *C. elegans* elude los céspedes de *Serratia* en medios de cultivo después de estar expuesto al lipopéptido durante un corto período de tiempo.

Una segunda función de los antibióticos bastante importante para las bacterias es la de actuar como señales químicas para la producción de biopelículas durante la fase de crecimiento estacionario, y la consiguiente adherencia a superficies. Las biopelículas permiten un intercambio más eficaz de nutrientes, oxígeno y moléculas señal, además de proteger a las bacterias productoras de la depredación por parte de protozoos. A lo que habría que añadir que representan un nicho importante en los mecanismos de transferencia genética horizontal. Como ejemplo, los β -lactámicos y los aminoglucósidos inducen la formación de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* a concentraciones subinhibitorias. En el caso de *Bacillus* y *Pseudomonas*, los lipopéptidos de función antibiótica juegan un papel importante en la adherencia a superficies y en la producción de biopelículas, aunque el resultado puede diferir en

función de las características fisicoquímicas del lipopéptido. Así, la surfactina activa una cascada de señalización que se inicia con la formación de poros, continúa con una pérdida de potasio, finalizando en una situación de estrés fisiológico y la producción de una matriz extracelular^[5].

La movilidad bacteriana, ya sea mediante *swimming*, *swarming* o *twitching*, es otra característica que puede verse afectada por los antibióticos. Así, lipopéptidos y ramnolípidos juegan un papel clave en la movilidad bacteriana, presumiblemente a través de su influencia en la viscosidad de las superficies colonizadas. Los lipopéptidos parecen estar implicados en la agregación en estructuras llamadas dendritas y en la coordinación de su movimiento en la zona frontal de *swarming*. Las típicas estructuras con forma de dedo observables en la movilidad tipo *swarming* están originadas por flujos líquidos, llamados flujos de Marangoni, que están inducidos por un gradiente de concentración de estos componentes antibióticos, que da como resultado un gradiente de tensión superficial. Las funciones de estos antibióticos con capacidad surfactante en el proceso de dispersión bacteriana en sus hábitats naturales está poco estudiado, aunque se ha postulado que en el caso de ambientes asociados a plantas, los antibióticos con capacidad surfactante actúan como agentes humectantes de las cutículas hidrófobas de las hojas, lo que facilitaría no sólo la movilidad, sino también la solubilización y difusión de sustancias necesarias para el crecimiento^[6].

Finalmente, los antibióticos desempeñan funciones nutricionales. De hecho, se trata de metabolitos secundarios producidos en situaciones en las que hay altos niveles de carbono frente a bajos de nitrógeno, utilizados como reserva de energía. Se ha comprobado que bacterias aisladas de suelo, diferentes desde el punto de vista filogenético, son capaces de subsistir empleando antibióticos como única fuente de carbono. Las ventajas selectivas y el fitness ecológico que se derivan del empleo de antibióticos como fuente de carbono para su crecimiento no están claras. Puede que la producción de antibióticos en la rizosfera incremente de forma indirecta el estatus nutricional de los organismos productores. También puede ser que modulen las características nutricionales de los suelos que habitan, incrementando la disponibilidad de sales minerales o alterando el flujo de nitrógeno en la interfase suelo-raíz de las plantas. Es el caso de *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391, que produce fenazina-1-carboximida y que muestra capacidad de disolver mediante reacciones redox óxidos de hierro y manganeso, en contraposición a un mutante de la misma cepa deficiente en la producción

de este antibiótico. Lo cual sugiere que los antibióticos con actividad redox pueden afectar al acceso de las bacterias al hierro y que la movilización de este nutriente puede suponer una ventaja ecológica para la célula productora^[7]. También puede ser que la producción de antibióticos incremente la disponibilidad de carbono en la rizosfera, como es el caso del aumento de la disponibilidad de aminoácidos en la misma, que podrían promover el crecimiento del organismo productor así como del resto de organismos asociados en este microhábitat.

Como siempre nuestra visión se queda muchas veces reducida a lo que nos interesa desde el punto de vista humano y no prestamos atención a lo demás. Es el caso de los antibióticos, a los que siempre hemos considerado, y seguimos haciendo, como armas defensivas y de ataque en nuestra lucha contra las infecciones bacterianas. Pero, aunque es una de sus funciones para los organismos que los producen, no es la única ni la más importante. Por ello, quizás no estaría de más que el ser humano, en su faceta

investigadora fuera más empático. Se pusiera en el lugar del otro y pensase más como el objeto de su estudio que como humano.

Referencias

- ¹Thomashow LS y otros. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In *Manual of Environmental Microbiology*, ed. CJ Hurst, GR Knudsen, MJ McInerney, LD Stetzenbach, MV Walter, pp. 493–99. Washington, DC: ASM Press. 1997.
- ²Davies J. What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. *Mol. Microbiol.* 4:1227–32. 1990.
- ³Monier JM y otros. Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:229–35. 2011.
- ⁴Allen HK y otros. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:251–59. 2010.
- ⁵Lopez D y otros. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:280–85. 2009.
- ⁶Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1875–83. 2003.
- ⁷Hernandez ME y otros. Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:921–28. 2004.

JÓVENES CIENTÍFICOS

Entrevista a Cristina Pogontke



Almudena Peláez

@Almu_op

Soy Almudena Peláez, estoy cursando el último año del grado en biología. Estos años en la universidad he disfrutado mucho aprendiendo las diferentes ramas de la biología sin saber cuál de ellas escoger. Finalmente me decidí por la fisiología vegetal. El mundo de las plantas me parece fascinante y por eso en el futuro me gustaría estudiar un máster y hacer el doctorado para poder especializarme e investigar en ese campo.

A continuación os presento una entrevista realizada a Cristina Pogontke, licenciada en biología y máster en biología evolutiva por la Universidad de Málaga. Actualmente Cristina está comenzando su proyecto de tesis doctoral bajo la supervisión del Dr. José M^a Pérez Pomares en el grupo de investigación «Desarrollo y Enfermedad Cardiovascular» perteneciente al Departamento de Biología Animal de esta misma universidad. El objetivo principal del proyecto en el que participa Cristina consiste en estudiar los mecanismos que controlan la capacidad reparativa del corazón de mamíferos. Es decir, conocer mejor qué moléculas están implicadas en los procesos de generación celular, tanto en condiciones normales como de daño y muerte celular, como es el caso de los eventos que se activan tras producirse un infarto de miocardio.

AP: Buenos días, en primer lugar, hableme de su investigación.

CP: Buenos días. Mi tesis está centrada en el estudio de los mecanismos que regulan la homeostasis cardíaca y de cómo se modifican dichos mecanismos en condiciones patológicas, concretamente tras el infarto de miocardio. Después del infarto de miocardio, o muerte masiva de cardiomiocitos, se produce una remodelación de la histoarquitectura del ventrículo, cuyo elemento central es una cicatriz con grandes cantidades de colágeno y que se descelulariza progresivamente. Inicialmente esa cicatriz de colágeno es ventajosa, ya que evita la hemorragia masiva tras el infarto, pero después se transforma en una cicatriz patológica que se extiende provocando la muerte de los cardiomiocitos adyacentes al daño, que aún están vivos. En colaboración con otros laboratorios queremos determinar por qué no se forman nuevos cardiomiocitos después de un daño masivo, algo que sí ocurre en un corazón normal. De hecho, a los 70 años, aproximadamente el 20 % de nuestros cardiomiocitos se han renovado y son distintos de aquellos con los que nacimos. Esta renovación parece basarse tanto en la presencia en el corazón de células madre cardíacas presentes en el corazón, todavía pobremente caracterizadas, como de progenitores y cardiomiocitos primitivos y poco diferenciados. El ori-

gen, localización y señales a las que responden estas células para sostener esa renovación homeostática se desconoce. En nuestro laboratorio creemos que el origen embrionario de estas células puede tener una gran importancia en su comportamiento y ser determinante para que las células madre cardíacas puedan diferenciarse en nuevos cardiomiocitos o en otros tipos celulares cardiovasculares. También nos estamos estudiando la localización específica de estas células madre cardíacas, ya que hemos observado que en muchos casos se encuentran situadas alrededor de los grandes vasos coronarios. Teniendo en cuenta que en muchos tejidos las células madre residentes se encuentran muy cerca de vasos sanguíneos tenemos razones para pensar que la interacción de células madre y el sistema vascular es importante para mantener las propiedades de estas células.

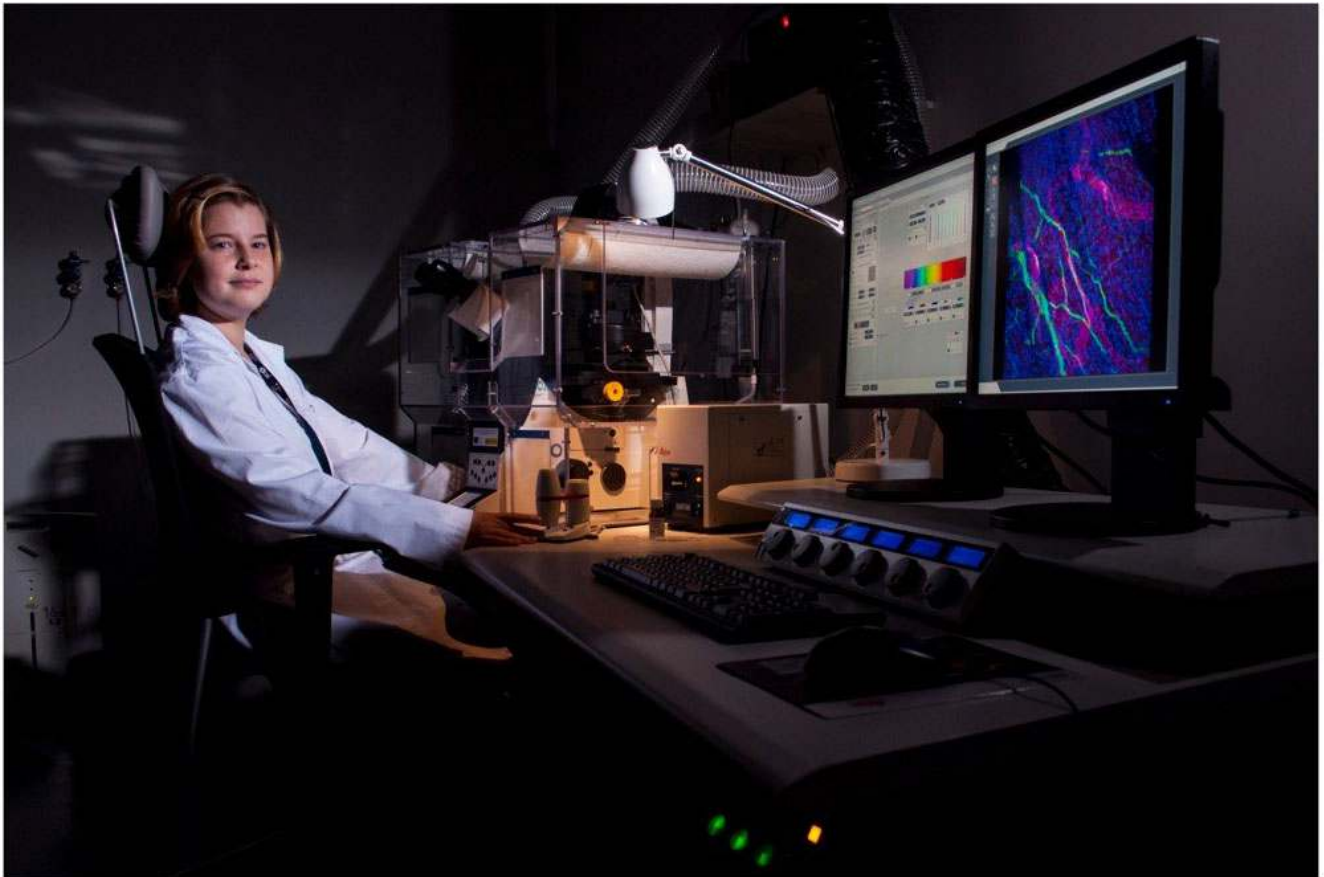
AP: Una pregunta más concreta: ¿Qué moléculas cree que están implicadas en los mecanismos de generación de cardiomiocitos?

CP: En principio, nosotros nos estamos centrando en las señales moleculares que podrían existir en ese posible nicho o microambiente en el que se encuentran las células. Como ya he mencionado, las células madre cardíacas en ocasiones están asociadas a vasos coronarios, y en muchas ocasiones estos vasos coronarios es-

tán asociados a otros vasos y a nervios, formando una especie de banda neurovascular regulada por numerosas moléculas, entre ellas neurotrofinas, de las que ya se ha descrito su capacidad para modular la actividad del óxido nítrico, una señal fundamental del endotelio vascular. Es por lo tanto razonable pensar que al encontrarse estas células situadas en esa localización tan singular podrían también verse afectadas por estas mismas señales.

AP: Entonces la neurotrofina sería la molécula clave.

CP: Es una posibilidad muy seria; sabemos que los receptores de neurotrofinas se encuentran presentes tanto en los nervios como en los vasos coronarios, lo que permitiría organizar una red de señalización muy compleja, ya que un mismo receptor puede interactuar con varias neurotrofinas y viceversa.



El trabajo de Cristina Pogontke Díaz se realiza bajo la supervisión del profesor titular de biología animal José M^a Pérez Pomares.

Créditos de la foto: Juan Miguel Pérez Ramos.

AP: ¿La investigación está centrada en mamíferos en general o en humanos?

CP: Nosotros empleamos como modelo de experimentación al ratón, ya que es una herramienta fundamental para nosotros por la gran disponibilidad de herramientas genéticas y moleculares que tenemos para trabajar con ellos, pero el objetivo final es que estos descubrimientos puedan, de alguna forma, ser aplicados a los humanos en el futuro.

AP: ¿Existe alguna diferencia significativa entre el proceso en ratón y en humanos?

CP: Actualmente eso se desconoce, porque los estudios en humanos son escasos; se ha descubierto la existencia

de algunas células madre cardíacas también en humanos, pero por razones obvias investigar con ellas es muy complicado. No obstante, ya se han realizado algunos de los estudios con la intención de obtener alguna generación muscular bajo el formato de ensayo clínico. Sin embargo, los resultados, de momento, no son muy positivos.

AP: Respecto al sexo, ¿influye que sea macho o hembra?

CP: La realidad es que este factor nosotros no lo tenemos en cuenta, ya que por ejemplo en nuestro caso el infarto de miocardio es inducido. Sí que es cierto que en humano, en varones la incidencia de infarto de

miocardio es mayor durante toda la vida mientras que en las mujeres esta tasa asciende después de la menopausia, pero esta es una cuestión que parece tener directamente que ver con la intersección entre señales endocrinas y la regulación metabólica.

AP: Por último, ¿puede haber alguna hormona implicada en el proceso?

CP: Las neurotrofinas no son hormonas, pero sí que son moléculas que son secretadas de manera muy regulada y por lo tanto también participan en la comunicación intercelular aunque a una distancia mucho menor, además de que no son, en principio, transportadas por la sangre.

AP: Como en el cuerpo siempre interactúan tanto las hormonas como los neurotransmisores, era

por si había alguna en concreto que actuara en el proceso.

CP: Es posible que alguna, como las que regulan el grado de dilatación de los vasos, esté implicada (el óxido nítrico, que hemos citado antes, es un ejemplo) y tal vez sería interesante considerarla para un futuro estudio.

AP: Es realmente interesante, enhorabuena por todo lo conseguido a lo largo de su carrera profesional. Espero que tengan mucho éxito con este proyecto y que, en un futuro cercano, aquellas personas con afecciones cardíacas puedan disfrutar de estos avances. Muchas gracias por colaborar con nosotros.

UNA ASIGNATURA PENDIENTE: LA NORMALIZACIÓN DE LA RT-qPCR A PENDING SUBJECT: NORMALIZATION OF RT-qPCR

por RAFAEL A. CAÑAS, M^a BELÉN PASCUAL Y FERNANDO DE LA TORRE

INVESTIGADORES DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. UNIVERSIDAD DE MÁLAGA.

rcanas@uma.es, bpascual@uma.es, fdelatorre@uma.es

Palabras clave: expresión génica, RT-qPCR, normas MIQE, genes normalizadores
Keywords: gene expression, RT-qPCR, MIQE guidelines, normalization genes

Enviado: 9 de noviembre de 2016
Aceptado: 12 de diciembre de 2016

En los últimos años, la biología molecular ha pasado por una serie de revoluciones técnicas. La RT-qPCR es una técnica con un papel principal en una de estas revoluciones. Desde su aparición, los análisis de expresión génica se han vuelto cuantitativos, más baratos y más rápidos, por lo que son más populares en la comunidad científica, difundiendo su uso por todos los laboratorios. Sin embargo, la técnica no es tan sencilla como la mayoría de los investigadores piensan. La incorrecta implementación de la RT-qPCR conduce a resultados inconsistentes e irrepetibles. Sin embargo, incluso en este momento, hay investigadores haciendo esfuerzos para reorientar esta situación estableciendo una serie de directrices como en el caso de las normas MIQE. Uno de los temas más problemáticos es la estimación de la expresión génica mediante la normalización de los resultados crudos de RT-qPCR. Por lo general, casi todos los investigadores consideran que la normalización se debe realizar utilizando genes de referencia con expresión estable en cada condición o tejido, los denominados genes «constitutivos». Sin embargo, este concepto ha sido superado por la experiencia que muestra que la selección de los genes de normalización debe lograrse a través de procedimientos experimentales siguiendo un «código de buena conducta» como las directrices MIQE.

In recent years, the molecular biology has gone through a series of technical revolutions. The RT-qPCR is a technique with a leading role in one of these revolutions. Since its emergence, the gene expression analyses have become quantitative, cheaper and faster, thus more popular in the researchers' community spreading its use across all the laboratories. However, the technique is not as easy as the most of researchers think. The incorrect implementation of the RT-qPCR leads to inconsistent and unrepeatable results. Nevertheless, even at this point, there are researchers making efforts to redirect this situation establishing a series of guidelines as in the case of MIQE standards. One of the most problematic issues is the estimation of the gene expression normalizing the raw results from a RT-qPCR. Usually, almost every researcher consider that the normalization must be performed using reference genes with stable expression in every condition or tissue, so-called "housekeeping" genes. However, this concept has been overcome by the experience showing that the selection of the normalization genes must be achieved through experimental procedures following a "code of good conduct" such as the MIQE guidelines.

La reacción de la polimerasa en cadena (PCR, siglas en inglés) es una de las tecnologías que han cambiado el mundo en los últimos 30 años. La PCR confiere a la humanidad la capacidad de realizar la replicación y amplificación *in vitro* del ácido desoxirribonucleico (DNA, siglas en inglés), convirtiéndose la manipulación y análisis de la molécula de la herencia en algo rutinario. Esto ha permitido un desarrollo extraordinario de la Biología Molecular, modificando la forma de trabajar en numerosas disciplinas biológicas y clínicas. Un ejemplo muy atractivo son los actuales métodos de secuenciación masiva del DNA que nunca se hubiesen podido desarrollar sin la PCR.

La principal fortaleza de la PCR está en su versatilidad a partir de la cual se han podido desarrollar numerosas variantes de la técnica primigenia con ob-

jetivos muy dispares (PCR anidada, PCR cuantitativa, PCR *in situ*, RT-PCR, RACE-PCR...). Quizá, la variante más extendida y de mayor impacto en la actualidad es la reversotranscripción seguida de una PCR cuantitativa (RT-qPCR, siglas en inglés). Esta técnica permite conocer el nivel de expresión de un gen (transcripción) a partir de la estimación de la cantidad de ácido ribonucleico mensajero (mRNA, siglas en inglés) de una muestra biológica. Por lo tanto, esta técnica ha sustituido en la rutina del laboratorio de Biología Molecular a la clásica técnica de *northern blot*, basada en la hibridación de moléculas de ácidos nucleicos y con una larga serie de inconvenientes (largo y tedioso desarrollo, menor fiabilidad de los resultados, frecuente uso de revelados radioactivos, resultados no cuantitativos...). El

principio de la RT-qPCR es muy simple. A partir de una muestra de RNA se sintetiza un DNA copia (cDNA), el cual será utilizado como molde para desarrollar una PCR a tiempo real (real-time PCR, siglas en inglés) empleando oligonucleótidos con secuencias específicas del gen cuya expresión se quiere determinar. Una de las principales ventajas de la PCR a tiempo real es que la cantidad de DNA producido puede ser monitorizada en todo momento. Para ello, se mide la fluorescencia emitida por sondas específicas de DNA unidas a fluorocromos o por compuestos químicos que al intercalarse entre las bases del DNA emiten fluorescencia. A partir de esta información se obtienen los datos que permiten, previo procesamiento matemático, estimar la cantidad de mRNA en una muestra problema. Lo que permite que esta información pueda ser realmente cuantitativa (absoluta) o semicuantitativa (relativa). Normalmente, en la práctica de laboratorio, el método más usado es el semicuantitativo, puesto que el cuantitativo requiere de curvas de calibración a partir de patrones de DNA que son muy dependientes de las condiciones en las que se lleva a cabo la técnica y de su análisis posterior. Para el análisis semicuantitativo se requiere uno o más genes de referencia cuya expresión sea estable en todas las muestras analizadas en un mismo experimento. Son los datos de estos genes los que se usan para normalizar matemáticamente la expresión de los genes que se quieren analizar.

El proceso de elaboración y análisis de datos mediante esta técnica puede ser realmente rápido permitiendo conocer la expresión de una decena de genes en cientos de muestras diferentes en tan solo uno o dos días. Esto provoca a veces una especie de ofuscación en el investigador ante la perspectiva de obtener una buena cantidad de resultados en poco tiempo. La materialización de este estado lleva al descuido, y a veces a la negligencia, de ciertos aspectos en la preparación y aplicación de la RT-qPCR. Esto ha conllevado la publicación de resultados falsos, no fiables o que nunca podrán ser repetidos experimentalmente^[1]. Tal ha sido y es la dimensión del problema que varios grupos de investigadores han propuesto diferentes métodos de estandarización (a nivel metodológico) de la RT-qPCR para una correcta aplicación de la técnica que permita la publicación de datos reproducibles y confiables. Entre estas propuestas la más aceptada se ha llamado «Información Mínima para la Publicación de Experimentos de PCR a Tiempo-Real Cuantitativa» (MIQE, siglas en inglés)^[2].

Lo extendido del uso de la RT-qPCR en su modalidad semicuantitativa provoca que la determinación y uso de genes de referencia sea uno de los prin-

cipales problemas en la aplicación de esta técnica. Conceptualmente el gen de referencia debe tener una expresión constitutiva en las muestras que se quieren analizar, por lo que los cambios en las medidas de la RT-qPCR han de deberse a variaciones experimentales, como la calidad del RNA de partida o la reacción de reversotranscripción y nunca a los tratamientos aplicados sobre las muestras. En principio, lo mejor sería tener genes de referencia «universales», cuya expresión fuese la misma en cualquier circunstancia. Esto permitiría ahorrar trabajo y comparar, siempre de la misma forma, los resultados para todas las muestras y genes problema. Por ello se acudió al concepto de genes «*housekeeping*», aquellos que mantienen una expresión constitutiva por estar encargados de las funciones celulares básicas. Así los investigadores se lanzaron a usar genes considerados como «*housekeeping*» para la normalización de las RT-qPCR, en muchos casos sin ningún tipo de comprobación experimental. Con el tiempo incluso se han llegado a hacer listas de genes de normalización/«*housekeeping*» clásicos (*factor de elongación 1 α* , *tubulina*, *actina*, *gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa*...). El problema ha llegado cuando se ha comprobado que el concepto de gen «*housekeeping*» no está tan claro, observándose que muchos de los genes catalogados en esta categoría no presentan una expresión constitutiva en todas las condiciones experimentales. Uno de los casos más famosos es el de la *gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa*, que después de ser usado como gen de referencia durante muchos años, se ha comprobado que posee expresión diferencial en diferentes tejidos o muestras. Por ejemplo, en los diferentes tejidos humanos^[3] y en respuesta a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*^[4]. Esto ha provocado que se empiece a considerar que un gen puede ser usado como referencia en una RT-qPCR siempre y cuando se haya confirmado previamente que su expresión es estable en las muestras a analizar, independientemente de cual sea su expresión en otros tejidos o condiciones experimentales. Es ahí donde entra en juego la realización de experimentos previos para validar el uso de un gen como referencia. Adicionalmente se han diseñado nuevas herramientas informáticas que evalúan estadísticamente los resultados de las pruebas y ofrecen índices para valorar la bondad de los genes para este uso. Entre las herramientas más usadas se encuentran *geNorm*, *NormFinder* o *BestKeeper*. Por ejemplo, en el caso de *geNorm* se considera que un índice inferior a 1 para la expresión de un gen en las muestras analizadas, sería suficiente para que se pudiese usar como referencia en una RT-qPCR sobre esas mismas muestras.

En determinados casos, la elección de los genes a validar es complicada. Si se usa un criterio «clásico» se está condenado a emplear genes por tradición sin ningún apoyo experimental. Por ejemplo, realizar una búsqueda bibliográfica y emplear genes de referencia previamente publicados y con algún tipo de error en su uso o en el diseño de los oligonucleótidos. Un error muy común se debe a la nomenclatura de los genes empleados. En un organismo pueden existir diferentes parálogos (genes diferentes que producen un mismo tipo de proteína en un mismo organismo) y en los artículos ser todos nombrados de la misma forma. Esto provoca que, bajo una misma denominación, se usen diferentes genes para la normalización. Por ejemplo, bajo el nombre de *Actina* se usan genes diferentes en trabajos realizados en *Arabidopsis thaliana*, cuya expresión es diferente según los tejidos y condiciones experimentales. Además del uso de una correcta nomenclatura y de identificadores para solucionar este problema, se han ideado nuevas estrategias en la búsqueda de genes de referencia más allá de la tradición o de un concepto. La mayoría de ellas se basan en datos transcriptómicos a gran escala que evalúan la expresión de miles de genes en decenas, cientos o miles de muestras diferentes seleccionando aquellos genes cuya expresión sea más estable (menor desviación estándar).

A otro nivel, también es importante considerar un último aspecto sobre los genes de referencia y es que su validación se realiza basándose en una pareja de oligonucleótidos concreta. Es decir, que podemos diseñar parejas de oligonucleótidos para un gen de expresión estable que no sean adecuadas. Esto realza la importancia de seguir unas normas como las MIQE para el diseño de los oligonucleótidos que permitan una especificidad óptima con una alta eficiencia (Figura 1). En un artículo recientemente publicado por nuestro grupo de investigación^[5] se comprueba cómo parejas de oligonucleótidos diseñadas bajo estos criterios presentan mejores resultados en cuanto a eficiencia y especificidad que las de otras parejas diseñadas sin tener en cuenta estos criterios.

Lo interesante de todo esto es comprobar cómo una técnica de rápida ejecución y que rinde gran cantidad de resultados es mucho más compleja de lo que los investigadores en general consideran. La bibliografía científica está repleta de pequeños y grandes problemas respecto a los resultados de la RT-qPCR. Y esto es si sólo tenemos en cuenta el efecto de una normalización deficiente de los resultados, en cuanto se profundiza algo más respecto a otros aspectos, como el diseño de las parejas de oligonucleótidos, el desastre se podría considerar mayúsculo. Y es que no hace más pan quien corre más sino quien trabaja mejor.

Referencias

- ¹Huang T y otros. The mRNA of the Arabidopsis gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science*. 309: 1694-1696, 2005.
- ²Bustin SA y otros. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55: 611-622, 2009.
- ³Barber RD y otros. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics*. 21:389-395, 2005.
- ⁴Dheda K y otros. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*. 37: 112-114, 2004.
- ⁵Granados JM y otros. Selection and testing of reference genes for accurate RT-qPCR in adult needles and seedlings of maritime pine. *Tree Genet. Genomes*. 12: 60, 2016.

Diseño de oligonucleótidos

- Uso de regiones flanqueantes de intrones o de regiones de alta especificidad como 3 UTR
- Diseño de oligonucleótidos usando programas como Primer3:
 - Tamaños de 18-23 nt
 - Amplicones de 70-150 nt
 - Evitar índices de auto-complementariedad mayores de 0
 - Tm de los oligonucleótidos similares (menores de 3°C)
 - Contenido ideal de G+C de 50-60%

Verificación del plegamiento del amplicón

- Uso de programas como mFold para su verificación
 - La temperatura de "annealing" de la qPCR se considera la temperatura de plegamiento
 - Verificación de la ausencia de estructuras secundarias intrincadas
 - Descarte de la pareja de oligonucleótidos si el amplicón tiene estructuras con valores de $\Delta G \leq -4$ kcal/mol

Figura 1. Ejemplo de criterios para el diseño de unos buenos oligonucleótidos para RT-qPCR. Figura propia basada en una anterior publicada por Granados JM y otros^[5].

Escribir bien no cuesta trabajo

LA RESPONSABILIDAD LINGÜÍSTICA DEL DOCENTE

Esta vez no voy a contar cosas que a veces escribimos mal porque no sabemos cómo se hace bien. En este artículo voy a tratar un tema al que no se le presta casi ninguna atención, porque con la fiebre del bilingüismo, la excelencia y la internacionalización, nos estamos olvidando de que el idioma es nuestro vehículo de transmisión de la información.

La triste realidad es que nos creemos que basta con transmitir una información nueva (o vieja) *de cualquier manera*, sin reparar en que lo que nosotros decimos y cómo lo decimos es la primera referencia que tienen nuestros estudiantes cuando se enfrentan a los nuevos conceptos que han de aprender. Siempre recordaré una anécdota cuando estudiaba zoología en tercer año de biología (hace tanto que prefiero no hacer cuentas), y una compañera empezó a comentarme ciertas características de los [⊗]mamalianos. De forma inocente entonces, le pregunté si se refería a los «mamíferos» o a otra cosa que yo desconocía. Su desconcertante respuesta fue que se refería, efectivamente, a los mamíferos, pero que como el profesor había dicho en clase 'mamalianos', ella había supuesto que esa forma de nombrarlas también era correcta. ¿Cuántos de nuestros alumnos siguen pensando que separar los decimales con punto es más 'moderno' simplemente porque sus profesores así lo hacen, en lugar de utilizar la coma como hacían en el colegio?

Ya sabemos que tanto nosotros, los docentes, como nuestros alumnos, tenemos que dominar el inglés para acceder a los resultados de investigación, así como para compartir los nuestros. Sin embargo, ni unos ni otros recibimos la formación necesaria sobre expresión oral y escrita en español, más allá de lo que estudiamos (y olvidamos) en el colegio y el instituto. Por supuesto, de traducción, ni hablamos. Como consecuencia de tanto leer y escribir en inglés, se nos *acaba corrompiendo el lenguaje materno* con expresiones y usos anglicistas innecesarios y ajenos a nuestras costumbres, simplemente porque al escribir en español estamos traduciendo mentalmente lo que hemos leído o aprendido en inglés. Luego, a base de repetir las expresiones incorrectas, nos habituamos a ellas y acaban pareciéndonos correctas. Fijaos que antes jugábamos a las cartas, pero últimamente estamos jugando [⊗]'a cartas' y [⊗]'a fútbol'.

Debería resultar evidente que los profesores estamos obligados a *utilizar el lenguaje con propiedad y*

elegir los términos con un significado concreto, sin ambigüedad. De esta manera, conseguiremos transmitir a los alumnos, aunque solo sea por imitación, la forma de expresarnos que es típica de los científicos, como parte de su formación. Esto quiere decir que, de manera especialmente crítica en las ciencias, los docentes no debemos limitarnos a 'arrastrar' una palabra o una estructura sintáctica de un idioma a otro con la manida excusa de que ambos términos 'se parecen', y menos todavía que es lo que 'decimos habitualmente' (falta la coletilla *en el laboratorio, donde no nos esforzamos en expresarnos con corrección*). Si no ponemos cuidado en esto, nuestras clases estarán plagadas de expresiones y conceptos imprecisos, equívocos o, lo que es peor, completamente falsos. Por ejemplo, *infantile* se refiere al 'lactante' (menor de 2 años), no es [⊗]infantil (de menos de 6 años); no podremos hablar de [⊗]clorina (*chlorine*), sino de 'cloro'; ni debemos 'asumir' (*assume*) sino 'suponer'; ni debemos [⊗]alicuotar (*aliquot*) en los protocolos, en lugar de 'hacer alícuotas'; ni hablar de *splicing* cuando tenemos los términos 'ajuste' o 'empalme'; y mucho menos construir una [⊗]'librería de genes' (*gene library*) en lugar de 'genoteca'. La lista de términos y expresiones es tan larga que ha dado para escribir varios libros y blogs sobre el tema.

Lamentablemente, la aparición de nuevos términos o conceptos en el ámbito especializado va a la par de las *malas traducciones* que los profesores solemos fijar (o hacer) involuntariamente. Aún peor, el ritmo de publicación de libros especializados que recogen la traducción correcta de esos nuevos términos al español es mucho menor que el ritmo al que se generan, con lo que las palabras que acaban fijándose por el uso corresponden a las traducciones nefastas realizadas por la necesidad de comunicarnos con otros colegas *en español*. Los profesores debemos ser más conscientes de que *estamos obligados a escribir y hablar con corrección* ante nuestros alumnos, que no les podemos transmitir la información igual que otro colega. Para ello, no basta con dominar la propia lengua, sino que hay que buscar las fuentes que nos impidan seguir perpetuando los errores. No es fácil, porque, a diferencia de los franceses o los catalanes y los gallegos, no contamos con ninguna entidad que contrarreste la terrible influencia del inglés y no contamos con una referencia fiable que nos guíe. Algunos creen que la Academia de la Lengua

y su *Diccionario de la lengua española* sirven de guía, pero, en realidad, son lo menos fiable para el lenguaje especializado.

Sugiero que cualquier profesor de ciencias tenga a mano el *Libro rojo* de Fernando A. Navarro (accesible por suscripción en www.cosnautas.com) y el *Diccionario de términos médicos* de la Real Academia Nacional de Medicina (recomiendo de nuevo la versión en línea y no el libro que se imprimió hace años). También se puede consultar mi pequeño grano de arena al respecto:

el libro *Ideas, reglas y consejos para traducir y redactar textos científicos en español*, cuya segunda edición está en prensa a cargo de la Fundación Dr. Antonio Esteve, mi Nanoblog, y las diferentes entradas que llevo escritas, y seguiré escribiendo, en esta revista.

Para los que estéis interesados en el tema, sabed que los próximos días 1, 2 y 3 de junio de 2017 se van a celebrar en Málaga unas jornadas sobre traducción científica y médica; podéis consultar el programa y cómo asistir en www.asetrad.org/jtcm17.

Para saber más:

[Ideas, reglas y consejos para traducir y redactar textos científicos](#)
[El nanoblog del Gonz](#)

UN CAUDALOSO RÍO DE CARBONO A MIGHTY RIVER OF CARBON

por FERNANDO DE LA TORRE*, EMILIO GUTIÉRREZ-BELTRÁN†, MARINA RUEDA*, JORGE EL-AZAZ*, BELÉN PASCUAL*, RAFAEL CAÑAS*

*DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. UNIVERSIDAD DE MÁLAGA.

† DEPARTMENT OF PLANT BIOLOGY, UPPSALA BIOCENTER, SWEDISH UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES, SE-75007 UPPSALA, SWEDEN.

fdelatorre@uma.es

Palabras clave: Fenilalanina, carbono, compuestos fenólicos, biotecnología
Keywords: Phenylalanine, carbon, phenolic compounds, biotechnology

Enviado: 11 de noviembre de 2016
Aceptado: 13 de diciembre de 2016

La ruta de biosíntesis del aminoácido fenilalanina, así como las posteriores rutas que conducen a la biosíntesis de un amplísimo abanico de compuestos de gran interés biológico y económico, son responsables de uno de los mayores flujos metabólicos en la biosfera. Paradójicamente, los mecanismos metabólicos y la regulación de estas rutas han sido insuficientemente estudiadas en décadas pasadas en parte debido a la complejidad de las mismas. En los últimos años se han producido avances significativos en nuestro conocimiento de estas rutas y su regulación a distintos niveles. Estos avances suponen la base para futuras mejoras biotecnológicas en áreas tan diversas como la generación de biomasa, la mejora de cultivos de interés nutricional o la producción de madera.

The metabolic pathway responsible for the biosynthesis of the amino acid phenylalanine, as well as the subsequent routes leading to the biosynthesis of a wide range of compounds of great biological and economic interest, are responsible for one of the largest metabolic fluxes in the biosphere. Paradoxically, the metabolic mechanisms and regulation of these routes have been insufficiently studied in past decades in part due to its complexity. In recent years there have been significant advances in our knowledge of these routes and their regulation at different levels. These advances are the basis for future biotechnological improvements in areas as diverse as the generation of biomass, the nutritional improvement of crops or the production of wood.

La superficie de nuestro planeta aloja gran número de ríos que conducen el agua desde las montañas hacia otros ríos, lagos o mares. Nuestro planeta posee además otros tipos de ríos, no menos caudalosos, como los que conducen a millones de coches cada mañana, los que conducen trillones de correos basura o los de estudiantes buscando un futuro mejor.

Los autores queremos dedicar este artículo a poner de manifiesto un río que aunque no siempre tenemos presente es fundamental para la vida en nuestro planeta, un río que brota del CO₂ atmosférico y fluye hacia la síntesis de un aminoácido, la fenilalanina (Phe), para desembocar en un mar gigantesco y variado de compuestos fenólicos. Los seres vivos necesitan un constante suministro de Phe como metabolito de partida para la síntesis de proteínas. Para las plantas, este aminoácido es además precursor de la síntesis de un amplísimo catálogo de compuestos de enorme importancia cuantitativa y cualitativa con papeles cruciales en el crecimiento, desarrollo, reproducción y defensa. Entre estos, y a modo de ejemplo, podemos encontrar a la lignina, elemento fundamental de la formación de las paredes secundarias de las células y base del armazón que sostiene a las plantas.

Resulta muy ilustrativo el hecho de que sólo la síntesis de este compuesto implica que entre el 30 y 40 % de todo el carbono fijado fotosintéticamente por las plantas sea canalizado hacia la síntesis de Phe para posteriormente generar este polímero.

En los últimos años, un conjunto de artículos científicos de gran impacto han ayudado a establecer un modelo metabólico que nos permite entender en gran parte la ruta de síntesis de este aminoácido en plantas. Una vez más, el estudio del metabolismo en plantas se ha valido de su comparación con las bien caracterizadas rutas metabólicas del mundo procarionta para dilucidar sus componentes principales.

Dos ejes metabólicos centrales del coloquialmente conocido como metabolismo central carbonado, la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato, son responsables de proveer los elementos de partida, fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato respectivamente. Estos dos compuestos, una vez transferidos al interior de los cloroplastos son transformados mediante las siete reacciones enzimáticas sucesivas que conforman la ruta del shikimato para dar lugar a un compuesto fundamental, el corismato (figura 1). Etiológicamente esta ruta toma el nombre del primer

compuesto de la ruta que pudo ser identificado, el ácido shikímico, que a su vez toma el nombre de la planta a partir de la que se aisló por primera vez *Illicium religiosum*, conocida como *shikimi* en Japón donde es muy apreciada como base para elaborar el incienso más valorado en los templos budistas.

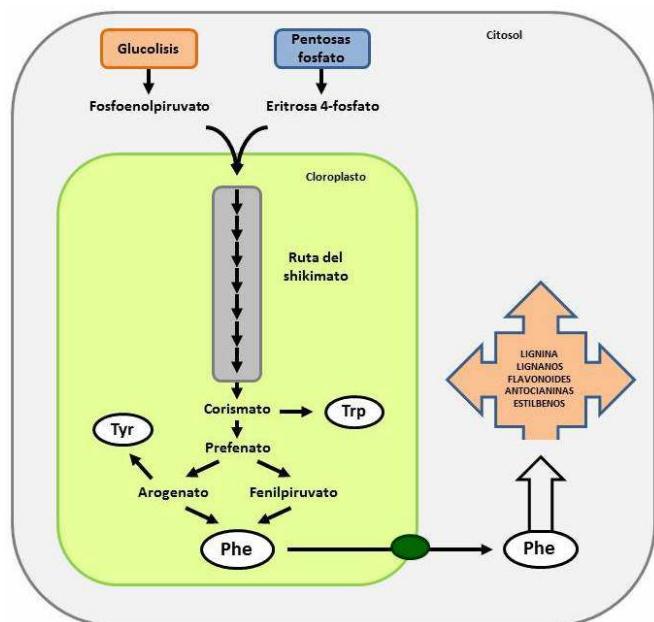


Figura 1. Biosíntesis y destinos metabólicos de la Phe en plantas.

Merece la pena hacer también una pequeña referencia etimológica al corismato. Esta palabra deriva de la palabra del griego clásico $\chiωριζω$ que significa «separar». La denominación no podría ser más acertada, ya que este compuesto es precisamente un punto de ramificación y separación metabólica fundamental precursor para otras rutas y para la síntesis de compuestos de importancia crítica para las plantas. De esta forma, el corismato es precursor para la síntesis de las vitaminas K1 y B9 o de la hormonal vegetal ácido salicílico. El corismato es además la molécula precursora de dos rutas independientes que conducen a la síntesis de los tres aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) (figura 1). En la primera de estas dos rutas, la enzima antranilato sintasa conduce el corismato hacia la síntesis de Trp que a su vez es precursor para la síntesis de compuestos de enorme importancia como los indol glucosinolatos, la camalexina o la hormona auxina. Esta ruta ha sido históricamente la mejor caracterizada de entre las implicadas en la síntesis de aminoácidos aromáticos precisamente como consecuencia de los grandes esfuerzos de investigación centrados en determinar la ruta de síntesis de la hormona auxina. La segunda de estas rutas se inicia mediante la acti-

vidad corismato mutasa que transforma la molécula de corismato en prefenato. Partiendo de prefenato las plantas disponen de dos rutas alternativas para la síntesis de Phe y otras dos para la síntesis de Tyr que difieren en los metabolitos intermediarios: arogenato y fenilpiruvato para la Phe y arogenato y 4-hidroxifenilpiruvato para la Tyr.

Centrándonos en el caso de la Phe debemos destacar algunos de los descubrimientos recientes que nos han permitido establecer un esquema general de su biosíntesis en plantas. En primer lugar, dos trabajos publicados casi simultáneamente a finales de 2010^[1,2] identificaron la enzima con actividad prefenato aminotransferasa responsable de la conversión de prefenato en arogenato, precursor directo de la síntesis de Phe y Tyr (figura 1). En el año 2014, nuestro grupo de investigación en la Universidad de Málaga dirigido por el Profesor Francisco M. Cánovas contribuyó a establecer el papel fisiológico de esta enzima en la biosíntesis cloroplastídica de aminoácidos mediante el estudio de su bifuncionalidad como prefenato aminotransferasa y aspartato aminotransferasa^[3]. Paralelamente, el laboratorio dirigido por la Profesora Natalia Dudareva en *Purdue University* (Indiana, EEUU) presentó los primeros resultados demostrando la existencia de una ruta alternativa para la síntesis de Phe usando fenilpiruvato como intermediario^[4] y de forma muy destacada describió por primera vez el mecanismo por el que la Phe es exportada desde los cloroplastos al citosol para servir de precursor en múltiples rutas metabólicas^[5]. Muy recientemente, nuestro grupo ha contribuido a la identificación y caracterización de las enzimas con actividad deshidratasa implicadas en ambas rutas de síntesis de Phe: prefenato deshidratasa y arogenato deshidratasa^[6].

Todos estos recientes avances son una importante base para afrontar futuras estrategias biotecnológicas encaminadas a modificar elementos estructurales y/o regulatorios de estas rutas con el objetivo de dirigir los flujos metabólicos hacia la síntesis de determinados compuestos fenólicos. Un ejemplo ilustrativo de este tipo de estrategias lo podemos encontrar en el trabajo desarrollado por el laboratorio de la profesora Cathie Martin en el *John Innes Centre* (Norwich, Reino Unido). Este grupo publicó recientemente un trabajo en el que describían como la simple expresión heteróloga de un factor de transcripción de *Arabidopsis*, AtMYB12, en plantas de tomate era suficiente para aumentar los flujos a través de las rutas del shikimato y biosíntesis de Phe para resultar en una acumulación masiva de compuestos fenólicos en sus frutos entre los que destacan los importantes antioxidantes del grupo de los

flavonoides^[7]. Estos resultados son sin duda, y seguro que lo veremos pronto, un importante punto de partida para el diseño de alimentos de nueva generación diseñados para mejorar nuestras dietas y reducir la incidencia de enfermedades como las relacionadas con el daño oxidativo.

Otro ejemplo de la importancia fundamental que tiene el conocimiento de los mecanismos moleculares que determinan los flujos a través de estas rutas lo encontramos en un área aparentemente tan alejada de los tomates como es la generación de biocombustibles. En este sentido, es sabido que la celulosa presente en la madera es un importante precursor para la producción de bioalcoholes como el etanol. La presencia en esta misma madera de elevados niveles de lignina es un elemento dramáticamente limitante en la eficiencia del procesado industrial debido a su capacidad para reducir la hidrólisis de la celulosa. Diversos consorcios de investigación a nivel mundial están actualmente enfocados en estrategias biotecnológicas que permitan modificar en la madera el contenido en lignina o su estructura/composición con el fin de facilitar su posterior procesamiento industrial.

En este sentido podemos destacar un trabajo publicado muy recientemente en el que mediante la simple manipulación de una de las rutas derivadas de la Phe e implicadas en la síntesis de lignina, los investigadores han conseguido la generación de álamos transgénicos capaces de aumentar en casi un 50% su producción de etanol^[8].

Sin ninguna duda las futuras décadas serán testigo de importantes avances científicos que tendrán a la Phe como protagonista y que pueden implicar cambios importantes para nuestra sociedad. Incluso más lejos de lo que ahora podemos intuir.

Referencias

- ¹Graindorge M y otros (2010). Identification of a plant gene encoding glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase: the last homeless enzyme of aromatic amino acids biosynthesis. *FEBS Lett.* 584, 4357-4360.
- ²Maeda H y otros (2011). Prephenate aminotransferase directs plant phenylalanine biosynthesis via arogenate. *Nat Chem Biol.* 7, 19-21.
- ³de la Torre F y otros (2014). Deciphering the role of aspartate and prephenate aminotransferase activities in plastid nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* 164, 92-104.
- ⁴Yoo H y otros (2013). An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine:phenylpyruvate aminotransferase. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms3833.
- ⁵Widhalm JR y otros (2015). Identification of a plastidial phenylalanine exporter that influences flux distribution through the phenylalanine biosynthetic network. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms9142.
- ⁶El-Azaz J y otros (2016). Identification of a small protein domain present in all plant lineages that confers high prephenate dehydratase activity. *Plant J.* 87, 215-229.
- ⁷Zhang Y y otros (2015). Multi-level engineering facilitates the production of phenylpropanoid compounds in tomato. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms9635.
- ⁸Cai Y y otros (2016). Enhancing digestibility and ethanol yield of Populus wood via expression of an engineered monolignol 4-O-methyltransferase. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms11989.

ENFERMEDADES RARAS CON ANGIOGÉNESIS DESREGULADA RARE DISEASES WITH DEREGULATED ANGIOGENESIS

por MIGUEL ÁNGEL MEDINA TORRES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA E IBIMA UNIDAD CB06/07/0046
DEL CIBER DE ENFERMEDADES RARAS (CIBERER)

medina@uma.es

Palabras clave: Enfermedades raras, angiogénesis, enfermedades dependientes de angiogénesis Enviado: 29 de enero de 2017
Keywords: Rare diseases, angiogenesis, angiogenesis-dependent diseases Aceptado: 7 de marzo de 2017

Se presenta una revisión acerca del interés de los estudios sobre las enfermedades raras y sobre la angiogénesis. Se propone fijar la atención en el subconjunto de enfermedades raras que cursan con una angiogénesis desregulada.

The interest of studies devoted to rare diseases or angiogenesis is herein reviewed. It is proposed to pay attention to dysregulated angiogenesis-related rare diseases.

Introducción

Las *enfermedades raras* son un conjunto sumamente heterogéneo de varios miles de patologías que tienen como único vínculo su baja prevalencia (menos de 5 casos por cada 10.000 habitantes, según la definición empleada por la Unión Europea, UE). Cada una por separado afecta a un pequeño porcentaje de la población (y ese ha sido el principal motivo por el que han estado insuficientemente atendidas hasta hace relativamente pocos años). Sin embargo, en global afectan a un 5-7% de la población de países desarrollados, lo que se traduce en cerca de 30 millones de afectados en la UE-27 (más de 3 millones en España). Todo lo dicho justifica que el «Plan de Salud Pública de la Unión Europea» contemple la inclusión de las enfermedades raras como objetivo prioritario de sus acciones, incluyendo la priorización y fomento de proyectos de investigación sobre este tema. A las normativas europeas se le han sumado en estos últimos años estrategias y planes de actuación sobre enfermedades raras, tanto de ámbito estatal como autonómico. Todas estas iniciativas públicas persiguen: 1) Mejorar el conocimiento sobre enfermedades raras. 2) Fomentar la creación de una red de información coherente y complementaria sobre enfermedades raras. 3) Facilitar el acceso a la información sobre enfermedades raras a los distintos colectivos implicados (investigadores, personal sanitario y pacientes y familiares). 4) Reforzar las acciones de trabajo social, incluyendo la colaboración transnacional entre el voluntariado y las organizaciones profesionales que prestan asistencia a las personas que padecen alguna enfermedades raras. 5) Garantizar una gestión adecuada de las asociaciones de enfermos y personas afectadas por enfermedades raras. 6) Favorecer la vigilancia de las enfermedades

raras, particularmente las menos comunes. Como declara el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), las enfermedades raras plantean toda una serie de retos que requieren la aplicación de métodos novedosos en un esfuerzo multidisciplinar (me atrevería a decir que interdisciplinar, o incluso transdisciplinar). Para atender a los tres primeros objetivos de las estrategias y planes de actuación sobre enfermedades raras antes mencionados, los enfoques sistémicos e integrados tales como los que puede aportar la nueva *biología de sistemas* parecen particularmente prometedores. La biología de sistemas es una nueva ciencia interdisciplinar que aúna la modelización matemática y los recursos bio-computacionales con los descubrimientos y contrastaciones experimentales para facilitar la comprensión de la organización global dinámica de sistemas biológicos complejos^[1].

El origen de las enfermedades raras

El 80% de las enfermedades raras son de origen *genético*. La identificación de los genes y mutaciones responsables de estas enfermedades es fundamental para establecer el conocimiento de las bases fisiológicas y para avanzar en el desarrollo de nuevas formas de tratamiento. Como la mayoría de las enfermedades de origen genético, el subconjunto de las enfermedades raras tiene una naturaleza genéticamente compleja. Probablemente todas las enfermedades hereditarias en humanos son producidas no por la mutación de un solo gen, sino por la combinación de mutaciones en múltiples genes diferentes^[2]. Además, la complejidad de las enfermedades raras no solo procede de las redes de genes implicados sino también de la combinación de mutaciones específicas en dichos genes. Muchas de estas proteínas al-

teradas son enzimas, por lo que dichas mutaciones se suelen manifestar como enfermedades metabólicas. Estas enfermedades conducen generalmente a un estado de sobrecarga como consecuencia de un proceso de desregulación metabólica. El desbalance de los flujos metabólicos se produce por la acumulación o la falta de disponibilidad de ciertos metabolitos en el complejo entramado que es el metabolismo celular. En la mayoría de las patologías metabólicas no se conoce a nivel molecular los detalles que desencadenan estos eventos, aún viéndose afectadas rutas metabólicas o de bioseñalización bien estudiadas. En el caso de las enfermedades raras el estudio es aún más complejo debido al restringido acceso a las muestras, por lo que se imposibilita un abordaje experimental para un estudio molecular exhaustivo. Estas circunstancias dificultan la planificación de estrategias eficientes para caracterizar las causas de la enfermedad y contrarrestarla con tratamientos.

Estrategias diferentes para enfermedades raras

En consecuencia, se necesitan nuevas estrategias para abordar este problema, siendo unas excelentes alternativas aquellas que se encuadran dentro de las líneas de acción propuestas por la biología de sistemas^[3]. En los últimos años se ha producido un importante desarrollo en el uso de modelos de redes de interacción en el estudio de enfermedades genéticas. El grupo de Barabasi ha desarrollado una red de patologías y genes implicados en enfermedades descubriendo el origen genético común de muchas enfermedades^[4]. Hace ya más de un lustro, se publicó el primer estudio de la red de enfermedades raras^[5]. Por otro lado, la búsqueda de dianas terapéuticas en el contexto del metabolismo celular se presta como un excelente campo de aplicación de todos los métodos desarrollados de modelado metabólico en el seno de la interdisciplina que denominamos biología de sistemas, existiendo precedentes de éxito siguiendo este enfoque^[6-8]. En definitiva, la complejidad de las enfermedades raras como objeto de estudio general las convierte en un sistema de estudio en el que se pueden (o deben) emplear de forma óptima los enfoques sistémicos que propician la biología de sistemas, los estudios basados en procedimientos biocomputacionales y los basados en tecnologías «ómicas».

Angiogénesis desregulada y enfermedades raras

La *angiogénesis* desregulada es considerada como una de las «señales distintivas» del cáncer^[9]. Esta relación con el cáncer es una circunstancia

que justifica que dicho tópico sea un tema candente de investigación biomédica a principios del siglo XXI (como se puede confirmar haciendo búsquedas sencillas en cualquier base de datos de literatura científica). En particular, la búsqueda de nuevos fármacos antiangiogénicos para el tratamiento y la prevención del cáncer es una área de máxima actividad para las principales compañías farmacéuticas del mundo y para numerosísimos grupos de investigación^[10-12]. Sin embargo, este mismo interés en la investigación de la angiogénesis patológica ha permitido acumular evidencias experimentales que relacionan sin ambigüedad una angiogénesis desregulada con numerosas patologías (muchas de las cuales no son neoplasias), hoy en día frecuentemente agrupadas como enfermedades dependientes de angiogénesis^[13-15]. El conocimiento de las complejas relaciones moleculares de regulación en este proceso será esencial para futuras mejoras de intervención preventiva y terapéutica^[16-18] y exigirá cada vez más el empleo de aproximaciones sistémicas tales como las que aporta la moderna biología de sistemas^[1].

Hace unos años, nuestro grupo realizó un exhaustivo estudio bibliométrico de la bibliografía científica relacionada con los tópicos «enfermedades raras» (ER) y «angiogénesis»^[19]. Un primer interesante resultado que dicho estudio arrojó fue la constatación de que más de un 3% de todas las enfermedades raras descritas en *Orphanet* (el mayor portal dedicado a recopilar información sobre enfermedades raras) están relacionadas con una angiogénesis desregulada. No es un porcentaje despreciable, pues representa casi 200 enfermedades de muy variada etiología y entre las que se encuentran no sólo enfermedades neoplásicas raras, sino también otras oftálmicas, dermatológicas, etc. Hay motivos para suponer que, a pesar de su gran diversidad, estas enfermedades raras dependientes de angiogénesis presentan algunos patrones comunes que, bien estudiados, podrían ser explotados para su intervención terapéutica. Hasta la fecha, el mayor éxito de aplicación de una terapia antiangiogénica para el tratamiento de enfermedades (no raras) dependientes de angiogénesis es el uso del anticuerpo monoclonal *Ranibizumab* (de la firma *Genentech*, comercializado con el nombre de Lucentis[®] por *Roche*) dirigido contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en el tratamiento de pacientes con degeneración macular húmeda, edema macular causado por oclusión de la vena retiniana y edema macular diabético^[20]. En 2010 se concedió el premio Lasker-DeBakey de investigación médica clínica a Napoleone Ferrara, por su descubrimiento del VEGF como un mediador fundamental de la angio-

génesis y por el desarrollo la terapia anti-angiogénica antes mencionada. Cabe preguntarse si ésta y otras terapias anti-angiogénicas aprobadas y utilizadas para el tratamiento de diversas enfermedades no podrían tener también su campo de aplicación para el tratamiento de algunas de las enfermedades raras actualmente identificadas como dependientes de angiogénesis. Por otra parte, hace falta mucha más investigación básica, traslacional y clínica para identificar, caracterizar y probar nuevos compuestos y fármacos anti-angiogénicos potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades raras dependientes de angiogénesis. De nuevo los enfoques de biología de sistema prometen ser muy útiles en el análisis de fármacos ya conocido para su reposicionamiento para el tratamiento de enfermedades raras. Ese podría ser el caso del dimetilfumarato, un compuesto usado desde hace decenios para el tratamiento de la psoriasis cuyo mecanismo de acción en el contexto de esta enfermedad hoy día conocemos que se basa en sus probados efectos anti-angiogénicos^[21]. Recientemente se ha aprobado el uso de fármacos cuyo principio activo es el dimetilfumarato para el tratamiento inmunomodulador de la esclerosis múltiple^[22].

Bibliografía citada

- ¹Vodovotz Y y otros. Translational systems biology of inflammation. *Plos Comput Biol* 4: e1000014, 2008.
- ²Badano JL, Katsanis N. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Genet* 3: 779-789, 2002.
- ³Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science* 295: 1662-1664, 2002.
- ⁴Goh KI y otros. The human disease network. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 8685-8690, 2007.
- ⁵Zhang M y otros. The orphan disease networks. *Am J Human Genet* 88: 755-766, 2011.
- ⁶Cascante M y otros. Metabolic control analysis in drug discovery and disease. *Nat Biotechnol* 20: 243-249, 2002.
- ⁷Hornberg JJ y otros. Metabolic control analysis to identify optimal drug targets. *Prog Drug Res* 64: 171-189, 2007.
- ⁸Gerber S y otros. Drug-efficacy depends on the inhibitor type and the target position in a metabolic network- a systematic study. *J Theor Biol* 252: 442-455, 2008.
- ⁹Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674, 2011.
- ¹⁰Albini A y otros. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res* 65: 10637-10641, 2005.
- ¹¹Quesada AR y otros. Do not say ever never more: the ins and outs of antiangiogenic therapies. *Curr Pharm Design* 16: 3932-3957, 2010.
- ¹²Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin* 60: 222-243, 2010.
- ¹³Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-936, 2005.
- ¹⁴Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 358: 960-966, 2005.
- ¹⁵Greenberg DA, Jin J. From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438: 954-959, 2005.
- ¹⁶Quesada AR y otros. Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Med Res Rev* 26: 483-530, 2006.
- ¹⁷Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 464-478, 2007.
- ¹⁸Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473: 298-307, 2011.
- ¹⁹Rodríguez-Caso L y otros. What is known on angiogenesis-related rare diseases? A systematic review of literature. *J Cell Mod Med* 16: 2872-2893, 2012.
- ²⁰Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy. *Nat Med* 16: xix-xxiii, 2010.
- ²¹García-Caballero M y otros. Dimethylfumarate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo: a possible role for its antipso-riatic effect? *J Invest Dermatol* 131: 1347-1355, 2011.
- ²²Linker RA, Haghikia A. Dimethyl fumarate in multiple sclerosis: latest developments, evidence and place in therapy. *Ther Adv Chronic Dis* 7: 198-207, 2016.

CIEN AÑOS DESPUÉS DE LA «BALA MÁGICA» ONE HUNDRED YEARS AFTER THE “MAGIC BULLET”

por JUAN JOSÉ BORREGO

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. UNIVERSIDAD DE MÁLAGA.

jjborrego@uma.es

Palabras clave: resistencia bacteriana a antimicrobianos, factores de virulencia, superbacterias, antibióticos antivirulencia

Enviado: 17 de febrero de 2017

Keywords: antimicrobial resistance, virulence factors, superbugs, antivirulence antibiotics

Aceptado: 7 de marzo de 2017

La exhaustiva utilización de los antimicrobianos antibacterianos en nuestra sociedad ha conllevado el incremento de la prevalencia de cepas bacterianas patógenas en diferentes ambientes, incluyendo el nosocomial. Estas cepas aumentan de forma importante el riesgo sanitario para animales y hombres, así como un incremento en el coste de la aplicación de programas de antibioterapia. En 2016, los Dres. Wenciewicz y Shapiro de la Universidad de Washington en Sto. Louis han ideado e implementado una nueva estrategia para el control de las «superbacterias» multirresistentes, consistente en el diseño de antimicrobianos contra determinados factores de virulencia de los patógenos bacterianos. El procedimiento se ha estudiado en los sideróforos (mecanismos de captación de hierro) de un patógeno oportunista Gram-negativo, *Acinetobacter baumannii*. Aunque solo se ha desarrollado un antimicrobiano antivirulencia contra los sideróforos, hay esperanzadoras perspectivas de que puedan diseñarse nuevos antimicrobianos contra otros factores de virulencia, como por ejemplo, enzimas degradadoras de antibióticos, cápsulas bacterianas, bombas de eflujo, proteínas de adhesión, etc.

Nowadays the wide and extensive application of bacterial antimicrobials have led to the increase of the prevalence of pathogenic bacterial strains in different environments, including the nosocomial. These strains possess an important sanitary threat for animals and humans, increasing the cost for bacterial diseases control. In 2016, Dr. Wenciewicz and Shapiro (University of Washington in Sto. Louis) developed a new strategy for the «superbugs» treatment. These authors hold a molecular model of pre-acinetobactin, a siderophore virulence factor produced by pathogenic strains of Acinetobacter baumannii. All human bacterial pathogens are susceptible to antivirulence antimicrobials, but not all in the same way. Thus, new antivirulence antimicrobials will be designed and developed against other virulence factors, such as antibiotic-degrading enzymes, bacterial capsules, efflux pumps, adhesin proteins, to name a few.

A finales del siglo XIX y comienzos del XX, el mundo se encontraba inmerso en guerras por la hegemonía de los Imperios, el británico, el alemán, el otomano, el japonés, el ruso, y el incipiente imperio norteamericano. Independientemente de las bajas en los campos de batalla, otra lacra asolaba aún más a la población del planeta en ese tiempo, «las grandes epidemias» de origen microbiano, principalmente la llamada «peste blanca» o tuberculosis pulmonar, epidemias de cólera, epidemias de gripe, etc., que diezmaron a la población. En esos días la sociedad estaba dividida entre los que esperaban el fin del mundo y aquellos que esperaban el descubrimiento de un «remedio milagroso».

En este mundo convulso surgieron investigadores que dedicaron toda su vida a desarrollar y formular sustancias que fuesen eficaces para luchar contra los microorganismos a la vez que tuvieran una mínima toxicidad para el paciente. Fue Paul Erlich (Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1908) junto con su

colaborador Sahachiro Hata, quienes desarrollaron el famoso preparado 606 (salvarsán), que denominaron como la «bala mágica». Con este compuesto se trataron diversas patologías de origen bacteriano, pero fue muy efectiva para el control de la sífilis humana provocada por el *Treponema pallidum*, además de su alta efectividad antibacteriana, el compuesto era inocuo para los pacientes afectados^[1].

No fue hasta los años 30-40 del siglo XX en que la incipiente quimioterapia tuvo su edad de oro, coincidiendo con el descubrimiento de los primeros antibióticos por los Dres. Domagk, Fleming, Chain y Florey. La aplicación de estos fármacos se ha extendido hasta nuestros días, controlándose de esta forma casi todas las enfermedades de origen bacteriano y micótico, aunque son ineficaces para la mayoría de las infecciones causadas por parásitos y virus.

El uso indiscriminado o abuso en la utilización de los antibióticos ha conllevado la aparición de un alto porcentaje de cepas bacterianas resistentes a es-

tos fármacos, que producen infecciones difícilmente controlables, que aumentan el riesgo sanitario y que incrementa los costes de tratamiento. En un informe de la OMS en 2016^[2] y ante el alarmante incremento de resistencia a antibióticos, se aconseja que «las autoridades sanitarias mundiales cambien urgentemente la forma de prescribir y utilizar los antibióticos en el mundo», y añade que «aunque se desarrollen nuevos medicamentos, si no se modifican los comportamientos actuales, la resistencia a los antibióticos seguirá representando una gran amenaza». Y concluye, «si no se toman medidas restrictivas y urgentes, el mundo está abocado a una era post-antibióticos en la que muchas infecciones comunes volverán a ser potencialmente mortales».

¿Por qué y cómo los microorganismos se hacen resistentes a los antibióticos?

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La primera es propia de cada familia, género o especie bacteriana. Por el contrario, la resistencia adquirida es variable y propia de una cepa de una especie bacteriana, siendo la principal causa del fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el microorganismo patógeno. Las bacterias son capaces de adquirir estos mecanismos de resistencia en función de su variabilidad genética, bien por mutaciones o mediante transferencia horizontal de material genético entre bacterias de especies relacionadas e incluso muy diferentes. Por tanto, la resistencia adquirida está codificada genéticamente, en genes del genóforo bacteriano o en genes plasmídicos.

Los mecanismos de resistencia a antibióticos pueden agruparse en cuatro categorías:

1. Inactivación enzimática: el principal mecanismo de inactivación es la hidrólisis, como ocurre con las β -lactamasas, pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas, como acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes del antibiótico.

2. Alteraciones de la permeabilidad: mediante alteraciones de las membranas bacterianas, alteraciones en la entrada de los antibióticos dependientes de energía, o por la presencia de bombas de flujo que aumentan la expulsión de los antibióticos.

3. Hiperproducción o alteración del sitio diana del antibiótico, como por ejemplo las alteraciones de las PBP (penicillin-binding proteins) o hiperproducción de la enzima dihidrofolato reductasa.

4. Aparición de nuevas rutas metabólicas: rutas alternativas al sitio diana de actuación del antibiótico.

Aunque se han realizado muchos esfuerzos para modificar químicamente a las formulaciones de los antibióticos^[3], la realidad es que la evolución de la dinámica del genoma bacteriano y la adquisición de nuevos genes a través de procesos de recombinación genética^[4], hace que esta estrategia no haya sido del todo efectiva y eficaz.

La «nueva bala mágica del siglo XXI»

Entre los microbiólogos clínicos se ha acuñado desde la década de 2010 el término de «superbacterias» (del inglés «superbugs») para referirse a aquellas bacterias patógenas que han desarrollado resistencia múltiple a un gran número de antibióticos. La presencia y el desarrollo de estas superbacterias es un peligro grave para la población humana, especialmente en los casos de pacientes con inmunodepresión o inmunosupresión. Además, para la implementación de un nuevo antibiótico y su uso en la clínica se requieren varios años de desarrollo y pruebas clínicas (más de 10 años), mientras que la evolución de la resistencia bacteriana a los antibióticos es un proceso rápido (menos de 1 año desde que un nuevo fármaco es introducido en la terapia antibiótica). Esta paradoja nos plantea una pregunta lógica: ¿cómo podemos luchar contra un enemigo que se hace resistente tan rápidamente?

En 2016, los investigadores Timothy Wencewicz y Justin Shapiro de la Washington University de St. Louis, han desarrollado una nueva estrategia de luchar contra los microorganismos patógenos y poder evitar el aumento de resistencia. Estos autores^[5] han diseñado antibióticos contra los factores de virulencia de los patógenos bacterianos (antibióticos antivirulencia) en lugar de utilizar los sitios dianas del crecimiento o mecanismos de supervivencia de los patógenos. Los antibióticos utilizados en la actualidad se pueden clasificar en bacteriostáticos y bactericidas; los primeros detienen el crecimiento bacteriano previniendo así la ulterior infección y diseminación bacteriana a diferentes tejidos u órganos del hospedador, y una vez detenido el crecimiento microbiano, los microorganismos son eliminados por mecanismos del sistema inmune. Por el contrario, los antibióticos bactericidas matan a las bacterias y no necesitan la directa asistencia del sistema inmune. Sin embargo, por medio del tratamiento por antibióticos –státicos o –cidas se ejerce una presión selectiva sobre la población bacteriana, creando un ambiente que permite la proliferación de los clones o bacterias individuales resistentes al antibiótico.

A diferencia de estos antibióticos tradicionales, los antibióticos antivirulencia actúan sobre vías o mecanismos bacterianos que son específicos en el proceso de patogénesis. Estos mecanismos o vías no son esenciales para el crecimiento o multiplicación normal de las bacterias, y sólo se activan cuando el patógeno establece un proceso infectivo con un hospedador. De esta forma, en el hospedador, los antibióticos antivirulencia actuarían como agentes bacteriostáticos, pero no afectarían ni al crecimiento ni a la proliferación bacteriana en los medios de cultivo, donde no se expresan los factores de virulencia propios de una infección, y como consecuencia, no inducirían mecanismos de resistencia a ellos.

El mecanismo exacto por el cual los antibióticos antivirulencia y el sistema inmune del hospedador interactúan conjuntamente para evitar la propagación del proceso infectivo depende de la diana antivirulencia. Por ejemplo, si se bloquea la producción de un factor de virulencia que posibilita al patógeno la evasión de los mecanismos de defensa del hospedador, entonces el microorganismo no es capaz de entrar «en modo oculto» y el sistema inmune puede detectarlo eficientemente y, posteriormente, eliminarlo. En otros casos, como por ejemplo bloqueando la producción de sideróforos microbianos, el microorganismo se convierte en una forma avirulenta, dando tiempo al sistema inmune a iniciar su respuesta específica que conducirá a su eliminación.

Todos los microorganismos patógenos humanos son potencialmente susceptibles de ser tratados con antibióticos antivirulencia, pero no todos de la mis-

ma forma, ya que los mecanismos de virulencia son específicos y exclusivos para cada patógeno. No obstante, hay algunas estrategias que pueden ser *a priori* más aplicables que otras. Además, hay un problema añadido al uso de estos agentes antivirulencia en la práctica antibioterápica humana o animal, que se basa en que es necesario para la aplicación de estos antibióticos de la determinación precisa y exacta del microorganismo patógeno, así como de sus principales factores de virulencia.

En la actualidad, como sabemos, la antibioterapia basada en el uso de antibióticos de amplio espectro obvian la previa determinación del agente causal de la infección, y hasta que no se cambie esta dinámica de tratamiento tradicional, solo los antibióticos antivirulencia podrán usarse en determinados ambientes, por ejemplo en los nosocomiales, para combatir las «superbacterias» multirresistentes.

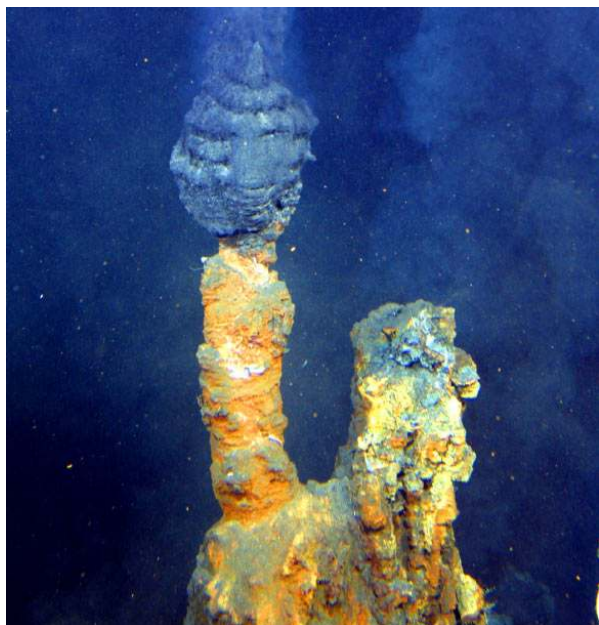
Referencias

- ¹Calvo, A. (2006). Erlich y el concepto de «bala mágica». *Rev. Esp. Quimioterap.*, 19: 90-92.
- ²OMS (2016). [Resistencia a los antibióticos](#). Nota informativa.
- ³Green, K.D. y otros (2010). Exploring the substrate promiscuity of drug-modifying enzymes for the chemoenzymatic generation of N-acylated aminoglucosides. *ChemoBioChem*, 11: 119-126.
- ⁴Pallen, M.J. B.W. Wren (2007). Bacterial pathogenomics. *Nature*, 449: 835-842.
- ⁵Shapiro, J.A. T.A: Wencewicz (2016). Acinetobactin isomerization enables adaptative iron acquisition in *Acinetobacter baumannii* through pH-triggered siderophore swapping. *ACS Infect. Dis.*, 2: 157-168.



Encuentros con las novedades

Viejas oxidadas, pioneras de la vida



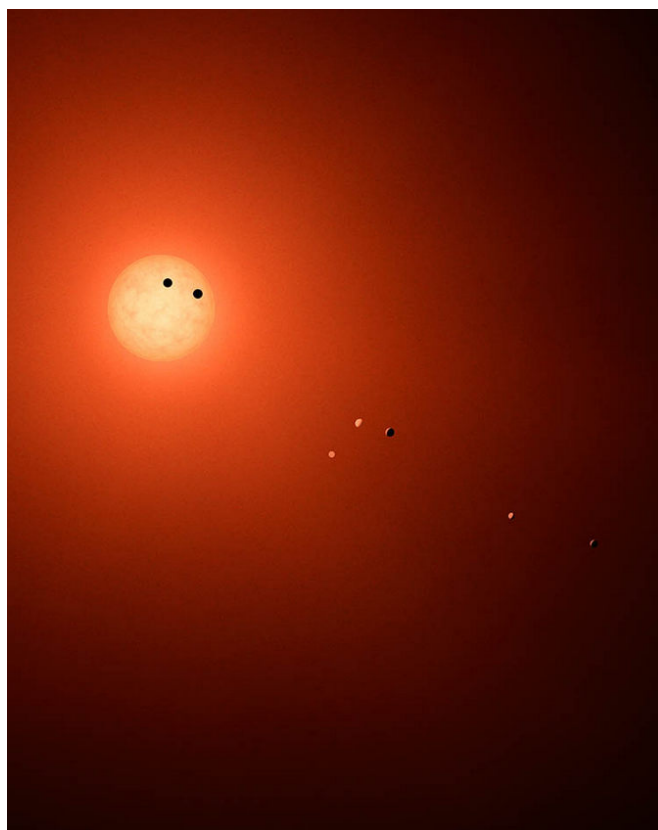
Créditos de la imagen

Matthew S. Dodd, del Centro de Nanotecnología de Londres y amigos de otros centros de investigación (*Nature* 543, 2017) han encontrado en el ártico canadiense unas rocas sedimentarias con microtubos fósiles de hematita oxidada, indicios directos de la actividad microbiana más antigua conocida hasta la fecha: hace al menos 3770 millones de años, ya existían bacterias capaces de obtener energía oxidando el hierro en los tumultuosos –químicamente hablando– ambientes de las primigenias chimeneas hidrotermales submarinas.

Hasta ahora, sólo se tenían evidencias de existencia de vida primigenia tan antigua por **indicios indirectos basados en discriminación isotópica**, así que estas serían las primeras pruebas indiscutibles sobre lo rápido que apareció la vida en la Tierra desde su acreción.

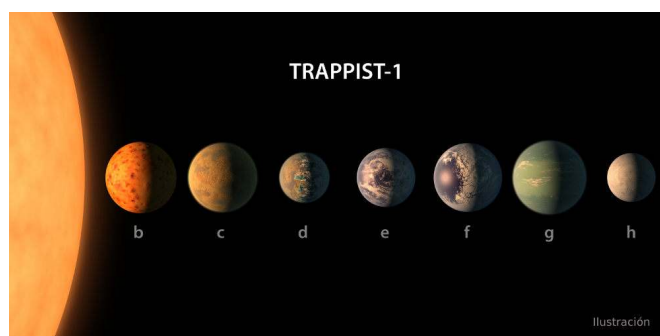
Además, dan una pista clave sobre el origen de la vida en la Tierra: la plácida *sopa caliente* a orillas de mar, de la que surgirían moléculas autorreplicantes, está dejando paso, cada vez más, a lugares mucho más extremos como las fosas volcánicas submarinas, donde la vida habría surgido cabalgando sobre un intercambio feroz de electrones entre reactivos químicos emanados de una Tierra recién formada. Esta hipótesis abre nuevas perspectivas para la búsqueda de vida extraterrestre, incluso indicios de la misma aquí al lado, en nuestro vecino rojo.

¿No quieres agua...? ¡toma tres Tierras!



Créditos de la imagen

En realidad 7 tierras, de las cuales 3 parecen contener agua, han descubierto Michaël Guillon y un multitudinario «et al.» internacional (*Nature* 542, 2017). Los sensores de infrarrojo del **telescopio espacial Spitzer** de la NASA señalaron la presencia de siete planetas rocosos alrededor de la estrella TRAPPIST-1, una enana roja a casi 40 años-luz de nosotros, durante su tránsito por delante de ella en una observación que duró tres semanas a finales de 2016.



Créditos de la imagen

Nombrados desde la *b* a la *h*, estos planetas y su estrella madre forman un mini-sistema solar que cabría dentro de la órbita de Mercurio. No obstante, lo importante para la biología es que tres de ellos se pasean en la zona de gracia donde el agua puede estar en fase líquida y, además, tienen el tamaño suficiente para que no se escape al espacio (como le ocurrió a Marte).



Créditos de la imagen

Ya se habían descubierto otras **gemelas de la Tierra**, pero este hallazgo por triplicado nos permite especular con un experimento sin parangón: el inicio de la vida, con tres réplicas. En el mismo sitio, casi las mismas condiciones, en las mismas circunstancias... ¡Es un regalo para los buscadores de **múltiples orígenes de la vida**! ¿Aparecen las mismas moléculas? ¿Se produce una contaminación de vida desde unos planetas a otros? ¿Se repiten los ciclos metabólicos? Lo único que podemos decir es que, si hay vida, habrá un ecosistema y, seguramente, con las mismas funciones en los tres planetas. Eso sí, interpretadas tal vez por distintos actores.

¡Y en sesiones más ligeras que las terrestres, pues allí un año dura entre uno y veinte días de los nuestros!

Ámbito y política editorial

La revista *Encuentros en la Biología* (ISSN 1134-8496) es una revista de divulgación científica con carácter interdisciplinar, está editada por la Universidad de Málaga y publica periódicamente (primavera, verano, otoño, invierno) aquellas contribuciones originales que se enmarcan en un ámbito de encuentro entre las ciencias biológicas y las demás fuentes de conocimiento científico; esto es, conocimiento testado experimentalmente y avalado al menos por una fuente primaria de documentación. Aceptará también la edición de biografías de autores relevantes, de reseñas de libros y trabajos especializados, de imágenes para la portada, la sección «La imagen comentada» y otras secciones especializadas, así como noticias, comunicaciones y eventos relacionados con la biología. La editorial valorará positivamente la contribución de los trabajos en un formato ameno y accesible para estudiantes y profesores de todas las áreas de la biología, al igual que la presentación de las últimas novedades científicas en este área.

Encuentros en la Biología es un foro de difusión abierto para todas aquellas personas que estén interesadas en enviar sus aportaciones. Las contribuciones así presentadas deberán ajustarse a la política editorial y a las normas que a continuación aparecen como «Instrucciones para los Autores». La revista se reserva el derecho a realizar cuantas modificaciones en forma y diseño estime oportunas.

Instrucciones para los autores

1. Todas las contribuciones presentadas deberán ser inéditas o contar con la autorización expresa del organismo que posea los derechos para su reproducción, en cuyo caso la edición incluirá la referencia de su autoría. Los manuscritos recibidos serán además sometidos a revisión con medios técnicos para detección de plagios.
2. Cada contribución constará de un título, el nombre completo del autor o autores, su afiliación (institucional, académica o profesional), su dirección postal, correo electrónico y teléfono. Para distinguir la afiliación de diferentes autores utilice símbolos (*, †, ‡, §, ¶, etc.) después del nombre de cada uno.
3. El documento se puede enviar en formato txt, rtf, sww/odt (OpenOffice/LibreOffice), doc/docx (MS-Word) o tex (LaTeX). Debido a las restricciones de espacio, la extensión no debe superar las 1600 palabras; en caso contrario, el editor se reserva el derecho a dividirlo en varias partes que aparecerían en números distintos.
4. Los nombres de las proteínas se escribirán en mayúsculas y redondilla (ABC o Abc). Los de genes y especies aparecerán en cursiva (*ABC*, *Homo sapiens*). También se pondrán en cursiva los términos que se citen en un idioma distinto al castellano.
5. Los autores que no sean castellanohablantes pueden remitir sus manuscritos en inglés. Una vez aceptado, el equipo editorial elaborará un resumen en castellano.
6. Las tablas, figuras, dibujos y demás elementos gráficos deberán adjuntarse en ficheros independientes. Cuando sea posible, utilice el formato vectorial no propietario pdf, svg, eps o ps. En caso de fotografías o figuras tipo *bitmap* se pueden enviar en formato jpg, tif o png con una resolución mínima de 300 ppp. Existe la posibilidad de incorporar breves animaciones en formato gif a baja resolución.
7. Las referencias bibliográficas se citarán dentro del propio texto, numeradas por orden de aparición. Al final del mismo, se incluirá la sección de *Bibliografía* o *Referencias* de acuerdo con el estilo del siguiente ejemplo:
¹Einstein Z y Zwestein D. Spatial integration in the temporal cortex. *Res Proc Neurophysiol Fanatic Soc* 1: 45-52, 1974.
²Sóbol I. *Método de Montecarlo*. MIR, Moscú. 1976.
 Si hay más de dos autores, se citará el primero seguido de «y otros».
 Si el texto principal no incluye referencias bibliográficas, se ruega a los autores que aporten 3-4 referencias generales «para saber más» o «para más información».
8. Se anima a contribuir a la sección *la imagen comentada* con imágenes originales o de libre distribución (300 ppp de resolución como mínimo) acompañadas en documento aparte con un breve comentario de unas 300 palabras relacionado con la misma (descripción, información, técnica, etc.).
9. Se considerará cualquier contribución para las distintas secciones de la revista.
10. Envío de contribuciones: el original se enviará por correo a los coeditores o a cualquier otro miembro del comité editorial que consideren más afín al tema de la contribución. Como último recurso, se pueden enviar por correo postal acompañados de un CD. No se devolverá ningún original a los autores.
11. La aceptación de todas las contribuciones se hará a petición de los miembros del equipo editorial, manteniendo en todo caso los co-editores la decisión final sobre la misma. También se podrá sugerir al autor mejoras formales o de contenido para adaptar el artículo al perfil de la revista. La notificación se enviará por correo electrónico al autor que figure como corresponsal.