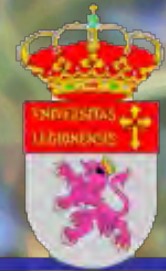
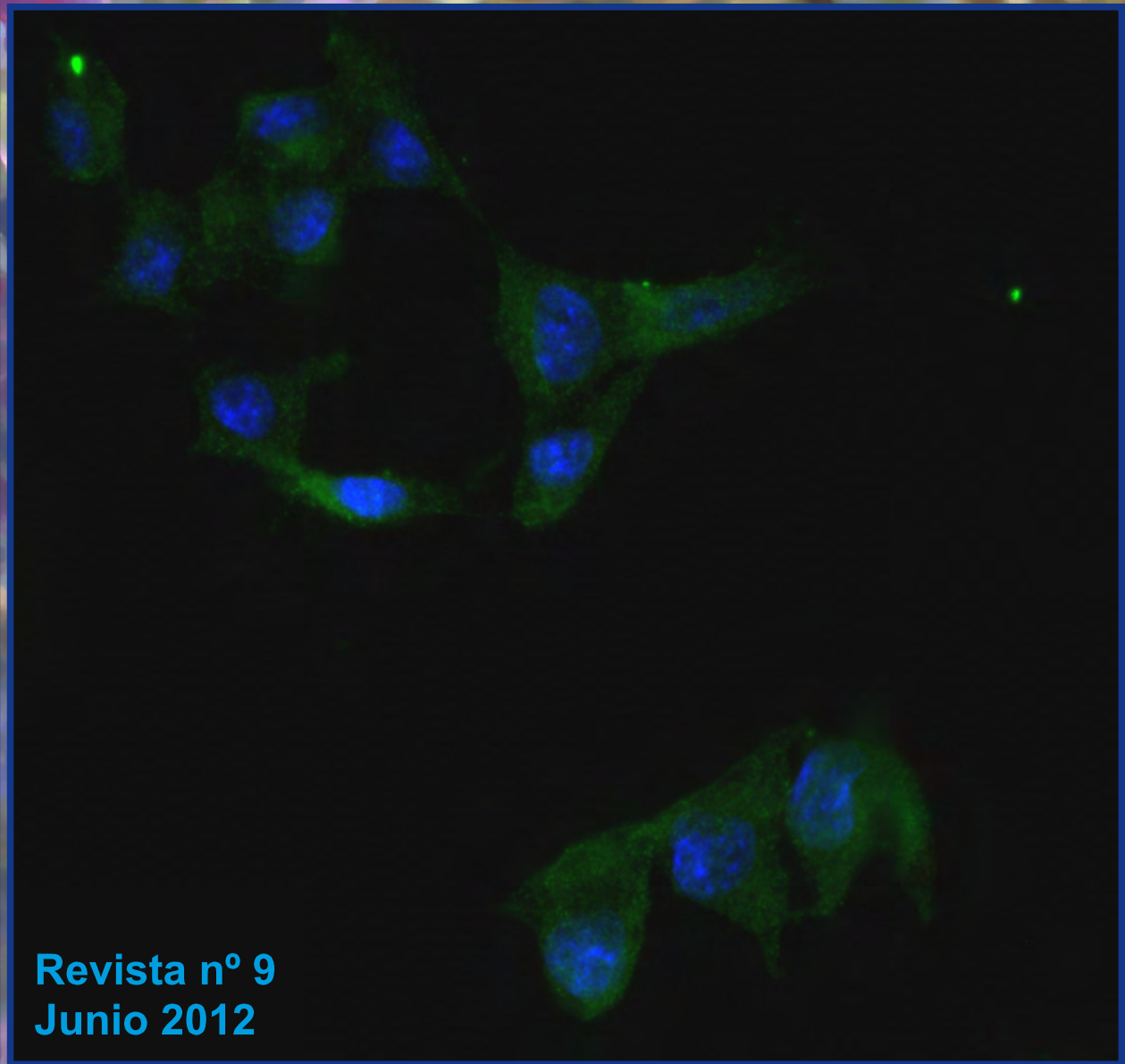


AmbioCiencias

REVISTA DE DIVULGACIÓN



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES. UNIVERSIDAD DE LEÓN



Revista nº 9
Junio 2012

★ 1968 ★



★ 2012 ★

Consejo de Redacción

Director:

José Luis Acebes Arranz

Profesor Titular del Área de Fisiología Vegetal

Secretario:

Francisco Javier Rúa Aller

Profesor Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular

Miembros:

Ana Alonso Simón

Profesora Asociada del Área de Fisiología Vegetal

María Luz Centeno Martín

Vice-Decana de la Facultad de CC. Biológicas y Ambientales

Antonio Encina García

Profesor Contratado Doctor del Área de Fisiología Vegetal

Delia Fernández González

Profesora Titular del Área de Botánica

Penélope García Angulo

Profesora Ayudante Doctor del Área de Fisiología Vegetal

Estanislao Luis Calabuig

Catedrático de Universidad del Área de Ecología

Juan Antonio Régil Cueto

Profesor Titular del Área de Zoología

Edita: Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León y Área de Publicaciones de la Universidad de León.

Maquetación: Ana Alonso Simón.

© **Universidad de León**

© **Los autores**

ISSN: 1988-3021 (edición digital), 2174-8942 (edición impresa)

Dep. Legal: LE-903-07



Universidad de León



Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales



En portada:

Células HepG2, derivadas de hepatocarcinoma humano, sometidas a condiciones de hipoxia y tratadas con melatonina. Mediante inmunofluorescencia se muestra en verde la presencia de HIF1-alfa (Factor inducible por hipoxia 1 alfa), los núcleos aparecen marcados en azul mediante DAPI. HIF1-alfa es un factor de transcripción que induce la transcripción de genes relacionados con la angiogénesis y proliferación tumoral. Ver artículo del Dr. Mauriz et al., pp.39-56. Foto de los autores.

ÍNDICE

Editorial

Experimentando la fascinación

José Luis Acebes Arranz.....3

A fondo

Bioquímica y cocina

Félix M. Goñi Urcelay.....6

Poniendo en claro

Nuevas terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer

José Manuel Jiménez Heras, Laura Lindo Yugueros, Laura Maeso Alonso, Daniel Martínez Manuel, Lorena Mata Gómez, Ana Pariente Delgado, Cayetano Pleguezuelos Manzano, Israel Prada García, Pablo Prieto Fuertes, Patricia Primo Arias, Ignacio Prusén Mota, Gabriel Ramírez Nieto, Daniel Roca Lema, Sonia Sánchez Bezanilla, Natalia Sanz Gómez, Eider Valle Encinas, Roberto Vázquez Fernández, Cristina Vega Carbajal, Paloma Vicario Sánchez, Lucía Villamañán de Santiago, Irene Villar Rúa, María C. Marín.....15

Siguiendo la pista

Descomposición de la capa de hojarasca de diferentes especies perennifolias y caducifolias

Irantzu Anzar Martínez de Lagrán, Beatriz de Arriba Ruiz, Beatriz Barrera Garmón, Álvaro Campón Sánchez, Raquel Carballo Castosa, Sandra E. Ciudad Broncano, Cristina Díaz Payno, Rocío García Gómez, Jesús Gil Pulido, Diego Herrero Alonso.....30

Baúl de la ciencia

Investigación básica sobre hepatocarcinoma en la Universidad de León

José Luis Mauriz Gutiérrez, Sara Carbajo Pescador, Javier Martín Renedo.....39



Uno de los nuestros

Lynn Margulis (1938-2011): la bióloga con visión revolucionaria

Antonio Encina García.....57

Mi proyecto de tesis

Riqueza de macroinvertebrados litorales de lagunas de montaña:
factores determinantes y patrones espaciales

Carlos Martínez Sanz.....70

Ambiólogos de aquí

30 años: de la Facultad virtual a la prima de riesgo

Antonio Javier Lucio Calero.....75

De todo un poco

Noticias de actualidad.....78



EDITORIAL

Experimentando la fascinación

La capacidad de asombro –aunque no venga como tal en los manuales– es uno de los rasgos que caracterizan a nuestra especie. La observación de nuestro entorno nos causa admiración; no lo contemplamos simplemente como algo exterior que-está-ahí-sin-más. En los niños esta capacidad de maravillarse se manifiesta muy pronto: basta ver cómo se dejan sorprender por el infinito número de estrellas en una noche de verano, por el color y la forma de una amapola, o por el lento caminar de una mariquita...

En etapas más adultas, en muchas personas esta fascinación por el entorno natural se va penetrando de una inquietud intelectual: a una capacidad de observación más aguda, se une el planteamiento de preguntas concretas, y la capacidad de desarrollar procedimientos y recursos para intentar responderlas. Surgen así los inicios de una vocación científica, que en una serie de estos “fascinados”, se va abriendo paso en unos estudios superiores.

Fascinados por las plantas

El 18 de mayo se celebró por primera vez a lo ancho de todo el mundo el Día Internacional de la Fascinación por las Plantas (FoPD-www.plantday12.eu). Promovido por la Organización Europea de Ciencias de las Plantas (EPSO), su objetivo era concienciar a la sociedad de la importancia que tienen las plantas para el presente y el futuro de nuestro planeta y poner de manifiesto la fascinación que sentimos por ellas. A esta Jornada se adhirieron casi 600 instituciones (Jardines Botánicos, Universidades, Ayuntamientos, Centros de Investigación, etc.), de 39 países. En España, se sumaron 34 instituciones que organizaron 42 eventos. Una de estas instituciones fue –en unión con la Oficina Verde– nuestra Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León (para más detalles, ver en este número la sección “de todo un poco”, p. 79).

Cuando el Decanato pidió iniciativas para elaborar un programa de actividades con el que se sumarse al Día Internacional de Fascinación por las Plantas, un grupo de profesores entendimos que se nos ofrecía una ocasión idónea para poner en marcha esta enorme fascinación por el entorno natural que bulle en nuestra comunidad universitaria.

Experimentando la fascinación por la divulgación científica

AmbioCiencias surgió en nuestra Facultad como un medio de dar cauce a otra fascinación que experimentamos en nuestra comunidad docente e investigadora, en nuestro entorno más inmediato y en el público en general: la



atracción por la divulgación científica

Uniendo la fascinación por las plantas y por la divulgación científica, este grupo de profesores nos propusimos plantear una actividad que divulgara características insospechadas de las plantas. Pero dando una “vuelta de tuerca” más al proyecto, pensamos que podíamos utilizar los laboratorios de la Facultad y experimentar con plantas para descubrir en ellas potencialidades desconocidas. Por ello la actividad sería un “taller”. Y en una nueva “vuelta” en el diseño pensamos: “¿y si fueran los propios universitarios –voluntarios, eso sí- los que se encargaran de poner en marcha el taller?” Fue dicho y hecho.

Líneas maestras de un proyecto de divulgación científica con plantas

Presentamos brevemente en nuestras clases las líneas maestras de la actividad: tal como habíamos acordado con el Decanato, el taller duraría hora y media, constaría de cuatro secciones, y se repetiría en cuatro sesiones a lo largo del día. Pedimos que los interesados nos enviaran un correo electrónico y a los que respondieron les convocamos a una reunión en la que les mostramos los seis pilares de la iniciativa:

1. Cada voluntario se encargaría de poner en marcha una de las secciones en al menos una sesión.
2. Ellos serían los que seleccionarían qué experimentos se presentarían y cómo se pondrían en escena.
3. Las actividades elegidas tenían que reflejar facetas imprevistas de las plantas, y su puesta en escena debía ir orientada a despertar el asombro.
4. Las “actividades”, como su nombre indica, deberían ser “activas”: no se trataba de “observar” ejemplares espectaculares, sino de trabajar con las manos, con los ojos y con la cabeza aspectos sorprendentes relacionados con las plantas.
5. Los experimentos que eligieran tenían que ser rápidos: habrían de completarse en un tiempo máximo de 20 minutos, de modo que los asistentes al taller pasaran por las cuatro secciones en la hora y media.
6. Por último, los experimentos tenían que ser didácticos: debían terminar con una breve reflexión y fijar una idea en la memoria.

Al terminar nuestra exposición, y después de responder a las cuestiones que nos plantearon, una pregunta quedaba en el aire: ¿se implicarán en el taller? Dibujamos una tabla en la pizarra con los turnos y secciones disponibles y la respuesta no se hizo esperar...: los 18 asistentes se apuntaron al menos a uno de los turnos; en general había más de un voluntario por turno y sección. De todos modos quedaban algunos huecos por cubrir, y después de proponer la iniciativa a nuevos alumnos, una semana antes del “Día” ya estaba completa la relación de los 25 monitores voluntarios del taller. Era un grupo heterogéneo de



alumnos, tanto de Biología como de Biotecnología, de grados y de licenciaturas, desde 2º hasta 5º curso, pero unidos por el reto que se les presentaba. Los días previos al taller estuvieron concretando qué experimentos harían: descartaron algunos interesantes, pero que resultaron largos, y otros espectaculares, pero que tenían demasiadas dificultades técnicas.

El taller “plantas en acción”

Llegó el “Día” esperado, y la fascinación por las plantas bullía por toda la facultad. El taller formaba parte de un conjunto de actividades simultáneas: una visita botánica al campus, la exposición “pinceladas florales”, otros dos talleres denominados “conociendo las variedades locales” y “pócimas y ungüentos naturales” (para más detalles, ver la sección “De todo un poco”, p. 79).

También el entusiasmo –unido con un cierto grado de nerviosismo- se había adueñado del laboratorio donde se desarrollaba el taller “plantas en acción”. Entre los participantes en el mismo se encontraban compañeros y familiares de los monitores, otros universitarios y público en general. Cada monitor iba equipado con su bata de laboratorio y se le reconocía por una pegatina identificativa personalizada. Algunos habían elaborado materiales complementarios (pósters y cuadernillos) para ayudarse de ellos en las explicaciones. Había actividades muy variadas, y estilos de presentación muy diferentes, pero todos ellos cubrían a la perfección los objetivos del taller: experimentar la fascinación por las plantas y por la divulgación científica.

El futuro

Muchos de los participantes y de los monitores comentaron: “habría que hacer algo como esto más a menudo”. La mayoría de los monitores ya han mostrado su interés en poner a punto iniciativas para un posible “segundo día internacional de fascinación por las plantas”, partiendo de la experiencia adquirida.

Llegue a todos (equipo decanal, profesores, monitores y participantes en la actividad) nuestro agradecimiento por el tiempo y por el esfuerzo dedicado. Pensamos que merece la pena crear ocasiones para seguir experimentando la fascinación por la vida y por la divulgación científica.

José Luis Acebes



A FONDO

Bioquímica y cocina

Félix M. Goñi Urcelay

Unidad de Biofísica (CSIC-UPV/EHU). Departamento de Bioquímica, Universidad del País Vasco, 48940 Leioa, Bizkaia

Este artículo tiene un origen bastante personal, por lo que quizá debo pedir disculpas. Se basa en mis reflexiones como cocinero casero, en las cosas que a veces pienso cuando estoy preparando la comida o la cena en mi casa. Mis amigos no científicos, que conocen mis tareas culinarias, me preguntan a veces: "en la cocina, ¿trabajas de manera parecida a como lo harías en el laboratorio?" Y, en no pocas ocasiones, la sospecha se hace más explícita: "¿tú cocinas con química?" Por no hablar de las ocasiones en las que salen a colación los alimentos transgénicos. Como es natural, estas preguntas y otras parecidas tienen las respuestas que cualquier lector de la Revista AMBIOCIENCIAS conoce bien. Pero, en su ingenuidad (normalmente vienen de personas bienintencionadas), a veces me han hecho reflexionar sobre estos temas, y a veces las reflexiones me han llevado por caminos poco trillados, alguno de los cuales paso a esbozar aquí.

¿Cómo cocino yo?

Básicamente, como cualquier otro, faltaría más. Cocino como todo el mundo. Y, sin embargo... ¿Cómo evitar pensar en la desnaturalización térmica de una proteína cuando estoy friendo un huevo? ¿Cómo ignorar la maravilla físico-química de la formación de una fase micelar al hacer la mayonesa? ¿Cómo cerrar los ojos a la oxidación de los polifenoles que ocurrirá sin remedio si no bajo el pH (añado zumo de limón) a las alcachofas recién moldeadas? Tenemos los bioquímicos, como cualquiera, una vida detrás, corta o larga, que no nos abandona, tampoco en la cocina. Todos tenemos una colección de vivencias que nos acompaña en el cocinar, como en el vivir: éste era el plato favorito de fulanito, recuerdo la trucha que comí en tal sitio, las lentejas que se me quemaron tal día... Solo que los bioquímicos, además, tenemos los recuerdos o conocimientos propios de nuestra profesión. Otros profesionales tendrán los suyos, sin duda, pero en pocos casos se dará como en el del bioquímico en la cocina, una actividad doméstica en la que se utilicen los mismos productos que en el trabajo, a veces con operaciones muy parecidas, pero con finalidad tan distinta.

Creo que si el cocinar me resulta en parte placentero, yo pienso que es por este parecido-pero-no-tanto de la cocina con la bioquímica. En concreto, tengo la impresión de que el laboratorio es el sitio donde llevo a cabo los experimentos ajustándome escrupulosamente a un protocolo, y con gran



frecuencia no llegan a buen término. Por el contrario, en la cocina basta con respetar unos procedimientos básicos; a partir de ahí uno hace lo que quiere/puede, y el resultado es casi siempre comestible. Mi actitud, comprensiblemente, es distinta en uno y otro caso.

El vitalismo nunca muere

Creíamos que Wöhler había acabado con él, al sintetizar en 1828 un compuesto biológico, la urea, a partir de una sustancia inorgánica, el cianato amónico. Pensábamos que la síntesis in vitro de ácidos nucleicos, por Ochoa y Grunberg-Manago en 1955, lo había rematado. Estábamos, en fin, convencidos de que toda la bioquímica del siglo XX había enterrado, con escasa pompa, al vitalismo. Pero en nuestros supermercados se venden tomates de "agricultura biológica", el personal quiere vino "sin química", y el carnicero nos ofrece, a su precio, pollos alimentados exclusivamente de forma "natural". Está claro, el vitalismo nunca muere. Quizá esto de seguir vivo es algo que el vitalismo "lo lleva en la sangre".

Es necesaria una importante labor pedagógica a este respecto. Debemos educar a nuestros conciudadanos, desde la niñez, en algunos aspectos básicos de la química biológica aplicada a la alimentación, y, sobre todos ellos el concepto, para nosotros obvio, de que no hay una barrera entre la química y la biología, entre la ciencia y la cocina; que los seres vivos están compuestos por moléculas químicas, que los seres vivos, en definitiva, somos química. Y, más allá de la teoría, debemos enseñar, y practicar, que la química nos ayuda a cocinar. Nunca hemos tenido a nuestro alcance más y mejores lácteos, vinos, panes y bollería, a precios asequibles. Todo ello, en gran parte, debido a la "química" de las levaduras. La química nos permite separar e identificar los componentes de los aromas, y así mejorar ciertos productos. E incluso operaciones absolutamente tradicionales de la cocina se basan en fenómenos químicos sencillos y perfectamente identificados, como el ya citado uso de ácidos para evitar el pardeamiento de las alcachofas, o el puñadito de sal en el agua en la que vamos a escalfar los huevos para unir el salting out a la desnaturalización térmica de la albúmina.

Aún creo que podemos dar un paso más en la batalla contra el vitalismo, que supone, en cierto modo, derrotarle con sus mismas armas. Un grave problema de Europa Occidental y América del Norte es el descenso de las vocaciones científicas. Nadie quiere ya ser químico, o físico, o geólogo. Estoy seguro de que las causas de este fenómeno son múltiples, pero estoy igualmente convencido de que una muy importante es la lamentable enseñanza de las ciencias en la escuela. Por lo que veo ahora mismo en los niños de la familia, la física sigue empezando por el movimiento uniforme, y la química por la



memorización de columnas de la tabla periódica, idealizaciones magníficas que honran a la humanidad... y espantan a los jóvenes humanos que se acercan a ellas. Es terrible pensarlo, pero para la práctica totalidad de nuestros adolescentes, la química consiste, sobre todo y ante todo en "sodio-litio-potasio... ¿cuál venía ahora?" Pues bien, la cocina y la alimentación nos ofrecen una oportunidad inmejorable de acercarse a los principios básicos de la ciencia. Empecemos las clases de química preparando una merienda con sándwiches de jamón y queso, fruta, y colacao. El sándwich nos permitirá introducir los azúcares, los lípidos y las proteínas. La diferente masa de pan y de queso nos llevará al diferente contenido energético de esos alimentos. Las modificaciones ocurridas en el tostado nos introducirán en las reacciones químicas, y el efecto de la temperatura en su cinética. Los diferentes sabores del plátano y la naranja nos llevarán a la acidez/basicidad y el uso del pH. La observación de que el sándwich se enfría más rápido que el colacao dará la oportunidad de discutir la naturaleza del calor y de la temperatura... Esta merienda nos proporciona materiales para un curso elemental de física y química, y sobre todo, nos asegura que vamos a dejar en los alumnos las dos ideas fundamentales de que: (a) la ciencia no está separada de la vida, y (b) los productos biológicos son susceptibles de análisis fisicoquímicos.

Física, química, y tecnología de los alimentos

La tecnología de los alimentos, sobre todo en lo referente a alimentos fermentados, como pan o bebidas alcohólicas, ha estado presente desde los albores de casi todas las civilizaciones. Sin embargo, esta tecnología ha tenido hasta hace poco un carácter meramente empírico, y no se ha beneficiado como debiera de los avances científicos de los últimos cien años. Solo en los últimos años la tecnología de los alimentos ha traspasado la barrera de la industria alimentaria para llegar a la restauración, y, en ciertos casos, incluso a la cocina doméstica. Hasta hace poco, cuesta creerlo, la restauración colectiva en colegios y hospitales ha estado basada en conocimientos empíricos desarrollados por rancheros de cuartel y hermanos legos de convento, con criterios en los que el equilibrio dietético y la salubridad de los ingredientes no estaban precisamente en lo alto de la lista.

Nos movemos, afortunadamente, hacia una sociedad más igualitaria. Nadie, en nuestro entorno, se muere de hambre. Pero ahora se trata de que todos comamos bien, y, para ello, necesitamos sistemas eficientes de producción, distribución y elaboración de alimentos. Las ciencias físicas, químicas y biológicas deben irrumpir donde ahora entran tímidamente, en la tecnología de alimentos y en las cocinas, sobre todo colectivas. No se trata ya de que unos pocos coman muy bien, ni siquiera de que todos comamos. Todos



debemos comer bien, y para eso es imprescindible la ayuda de la ciencia. Ni que decir tiene que los “temidos” organismos genéticamente modificados, han de jugar aquí un papel protagonista.

Un último comentario sobre el tema ciencia-tecnología-cocina. En los últimos diez años, gracias sobre todo, pero no solo, a Ferrán Adriá, han aparecido en muchas cocinas, incluso domésticas, artilugios que asociamos habitualmente al laboratorio: balanzas granatarias, pipetas, termómetros de todo tipo, trompas de vacío y mil cachivaches más. Quitando lo que este movimiento pueda tener de esnobismo, no cabe duda de que introduce variedad en la elaboración y presentación de los platos, y eso siempre es positivo, incluso si no supone cambios sustanciales en la nutrición. Por otra parte, cualquier cocinero curioso ha incorporado con agradecimiento a su arsenal al menos las pipetas desechables. No es ésta la revolución de la tecnología de los alimentos que algunos reclamamos, pero es una novedad agradable y bastante inocua.

La cocina como pre-digestión

Se ha dicho, con razón, que solo la especie humana cocina. No solo eso, sino que es claro que el cocinado de los alimentos ha supuesto un componente importantísimo de la evolución cultural. Nada sabemos de cómo empezó todo esto. ¿Fue el cocinado en frío, o en caliente? ¿Fue el acto consciente de un genio desconocido, o fue el hambre, gran aguzador de ingenios, que impulsó a alguien a comer carne de algún animal abrasado en un incendio? Ni lo sabemos ni lo sabremos, solo está claro que en la actualidad la especie humana, casi sin excepción, se alimenta mayoritariamente de alimentos cocinados.

¿Qué ventaja evolutiva, en el terreno, insisto, de la evolución cultural, proporciona el cocinado a la especie humana? En mi opinión hay una muy clara, a saber: la cocina efectúa una pre-digestión de los alimentos, y ayuda a su digestión posterior, de modo que podamos ingerir más alimentos con menos esfuerzo, gastar menos energía para digerirlos, y completar la digestión en menos tiempo.

La pre-digestión se aplica a los tres grupos mayoritarios de biomoléculas en la digestión. En el caso de los glúcidos, y particularmente de los polisacáridos, la cocina los hidrata (como cuando cocemos el arroz, la pasta o las legumbres), y los hidroliza ligeramente. Es lo mismo que hace la saliva y el jugo gástrico.

En el caso de los lípidos, la cocina los emulsiona, como las sales biliares en el intestino delgado. A veces los lípidos aparecen naturalmente en forma de emulsión, como en la leche y en la yema de huevo. Pero también estas emulsiones naturales ayudan en la cocina a emulsionar otras grasas. Ejemplos típicos de salsas emulsionadas con huevo son la mayonesa y la holandesa, que



utilizan las propiedades surfactantes de la fosfatidilcolina de la yema de huevo. La leche, o su derivado más tensoactivo, la nata, sirven para estabilizar numerosas salsas y cremas. Otras veces, las emulsiones se estabilizan con otros agentes. El bacalao al pilpil genera una salsa que no es sino una emulsión de aceite de oliva en agua, estabilizada por proteínas de la piel del pescado con propiedades surfactantes.

Las proteínas sufren, durante el cocinado, esencialmente un proceso de desnaturalización, lo que las hace más accesibles a las proteasas digestivas. Esta desnaturalización ocurre por lo demás en el estómago, ayudada por el ácido clorhídrico. Al pensar en la cocina, nos hacemos normalmente la idea de tratamientos térmicos, y, en el caso que nos ocupa, de la desnaturalización térmica de las proteínas. Esto es así casi siempre, pero no siempre. Si pensamos en el cebiche peruano, o en nuestros boquerones en vinagre, encontraremos ejemplos de proteínas alimenticias desnaturalizadas por ácido, como desde siempre venía haciendo el estómago.

En general, los métodos en caliente aplicados a carnes y pescados tienen la ventaja de activar, durante el calentamiento y antes de causar su desnaturalización térmica, a las hidrolasas lisosómicas, que por lo tanto causan ya una primera hidrólisis parcial de glúcidos, lípidos y proteínas. Otras veces la cocina introduce, por supuesto de manera empírica, sustancias químicas o bioquímicas que ayudan a la digestión. Es el caso de los platos tropicales tradicionales que combinan carne y piña, o papaya, ambas ricas en la proteasa papaína que no se inactiva ni siquiera con el pH ácido del estómago. Otras veces se añade bicarbonato sódico ("levadura química") para producir en los postres o en los fritos una suspensión de aire en sólido, que apreciamos grandemente en unos buñuelos, o simplemente en el pan. El pan es un extraordinario objeto físico-químico, una suspensión de aire en sólido, estabilizada por una proteína, el gluten del trigo, que adquiere sus propiedades mecánicas elásticas durante la cocción. Los que han intentado preparar pan sin gluten para celíacos saben del papel casi insustituible de esta proteína para obtener un pan comestible. Como en otros procesos de cocinado de féculas, en la preparación del pan interviene la hidratación y la hidrólisis parcial durante el cocido. Pero es la generación de CO₂ por las levaduras lo que hace al pan un alimento ligero, fácilmente palatable, masticable y deglutible. Solo en casos de mucha penitencia se puede comer el pan ázimo (sin levadura).

La formalización físico-química de la cocina

Hace ya más de treinta años que tuve la oportunidad de conocer en su casa y compartir mesa y conversación con José María Busca Isusi (Zumárraga 1916-1986). Busca Isusi era un vasco ilustrado que en vez de hacerse ingeniero o



cura, como todos los de su generación, tuvo la extraña idea de estudiar la licenciatura de Ciencias Naturales (que luego se escindiría en Biológicas y Geológicas) en la entonces Universidad Central, en Madrid. Busca Isusi fue un renombrado escritor y conferenciante en los años sesenta y setenta del siglo pasado, especializado en temas gastronómicos. En la radio y en el periódico hizo el papel de los telecocineros de nuestros días. En concreto, fue el gran divulgador de las pastas italianas y de los alimentos congelados, ambos tipos de comidas poco utilizados y hasta despreciados por entonces. La cultura gastronómica de Busca Isusi no conocía límites y su conversación nos fascinó.

Uno de los temas, que a mí me sorprendió por completo surgió cuando alguien mencionó la habilidad de tal o cual cocinero para dar el punto a sus guisados. Busca Isusi sentenció: "el punto no existe". Y ante nuestro asombro continuó: "llegará el día en que se definan para los alimentos parámetros físico-químicos, de manera que la aplicación exacta de tiempos, temperaturas y métodos de cocción conduzca infaliblemente al pretendido punto, que dejará de ser algo mágico". Ha llovido mucho desde entonces, pero el tiempo ha dado la razón al gran gastrónomo guipuzcoano. Los buenos cocineros modernos te cuentan con absoluta naturalidad que han cocido un huevo a 62°C durante 40 minutos, y te muestran lo que a nuestros ojos son incubadores metabólicos o estufas de precisión que utilizan en sus preparaciones o, más todavía, te relatan el número de horas que pasan adiestrando a sus proveedores para poder disponer de una verdura, de una carne o de un pescado con lo que nosotros llamaríamos "propiedades reproducibles" de madurez, tersura o aroma. Si Busca Isusi levantara la cabeza... no saldría de los fogones de Josean Alija, o de Andoni Luis Adúriz, por decir algún nombre.

Para terminar estos comentarios un tanto inconexos, voy a reproducir uno de los mejores ejemplos que conozco de formalización físico-química aplicada a la cocina. Me refiero al diagrama de fases triangular aplicado a la repostería, invención de Ernest Lester Smith, que dirigió durante muchos años los laboratorios de investigación de Glaxo en Hastings (Inglaterra). La repostería es sin duda la parte más cuantitativa de la cocina. Se puede preparar una comida entera añadiendo los ingredientes "a ojo", pero no se puede hacer una tarta sin una balanza o un medidor de volúmenes. Según Smith, cualquier receta de panadería o repostería contiene dos o más de los siguientes ingredientes: harina, grasa, huevo, líquido (leche o agua) y azúcar. Pues bien, las proporciones de los tres primeros se pueden representar como un punto único en un diagrama triangular. Esto se basa en que para cualquier punto dentro de un triángulo equilátero, la suma de las distancias perpendiculares de este punto a los tres lados es constante.

Los tres vértices del triángulo (Fig. 1) representan respectivamente

100% de harina, 100% de huevo y 100% de grasa. Conforme avanzamos a lo largo de los lados, la proporción de ese componente disminuye como se indica en la escala, y aumenta la proporción del componente situado en el otro vértice.

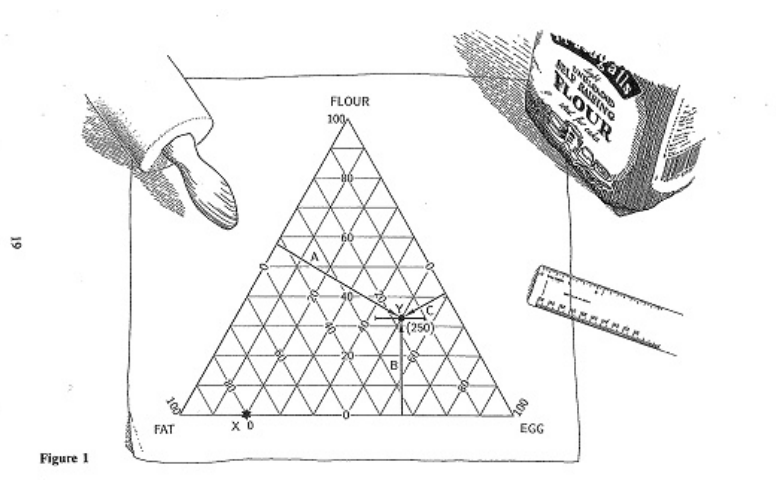
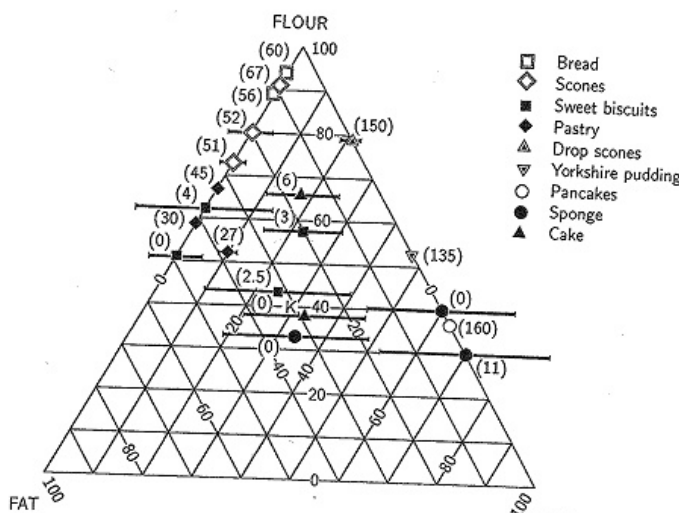


Figure 1. El diagrama de fases triangular de la repostería. Tomado de Kurti y Kurti (1988), p. 19.

Por ejemplo el punto X de la Fig. 1 corresponde a un 80% de grasa y un 20% de huevo, todos los porcentajes en peso, lo que sería una receta razonable para una salsa holandesa. El punto Y corresponde a un viejo postre inglés, el "baked batter pudding", que contiene 33% de harina, 17% de grasa (mantequilla o margarina) y 50% de huevo. A esto hay que añadir, como es natural, las cantidades necesarias de azúcar y líquido.

La belleza del sistema es que se puede utilizar para comparar grupos de recetas y transformar unas en otras. Ninguna receta contiene menos del 30% de harina, ni más del 50% de grasa, ni más del 70% de huevo (Fig. 2). En la zona cercana al 100% de harina, con un poco de grasa, tenemos las recetas caseras de pan. Si aumentamos la proporción de grasa hasta un 40-50% tenemos la pasta brisa o la pasta de hojaldre. En el lado derecho, cantidades aproximadamente



iguales de harina y huevo nos dan el popular Yorkshire pudding que acompaña al roast beef, y aumentando la proporción de huevo obtenemos... los crêpes y bizcochos.

Figure 2. Diagrama de fases triangular que incluye ejemplos de diversas preparaciones de repostería. Tomado de Kurti y Kurti (1988), p. 20.

El centro del triángulo corresponde a una vieja receta victoriana de bizcocho, que incluía harina, grasa y huevo a partes iguales (más otra parte de azúcar, sin líquido). A partir de este punto central, hacia la derecha, vamos incluyendo menos grasa y la receta se convierte, como hemos visto, en una mezcla para crêpes, o para bizcocho. Si, por el contrario, nos movemos hacia la izquierda (menos huevo) llegamos a la zona de las galletas y pastas de té. Finalmente, moviéndose del centro hacia arriba (más harina) obtenemos los tradicionales cakes de frutas.

Hay algo negativo en esta representación, y es que nos muestra a las claras que el número de recetas posibles es finito, y que, de hecho, no hay zona del diagrama accesible en la práctica, que no haya sido ya utilizada. Lo mismo ocurre a la Madre Naturaleza, a pesar de sus 4000 millones de años de experiencia, cuando quiere jugar a cocinitas con la esfingomiolina, la fosfatidilcolina y el colesterol (Fig. 3). Se pueden mezclar en muchas proporciones, pero no en todas, y no siempre vamos a obtener la bicapa fluida que les apetece a nuestros enzimas.

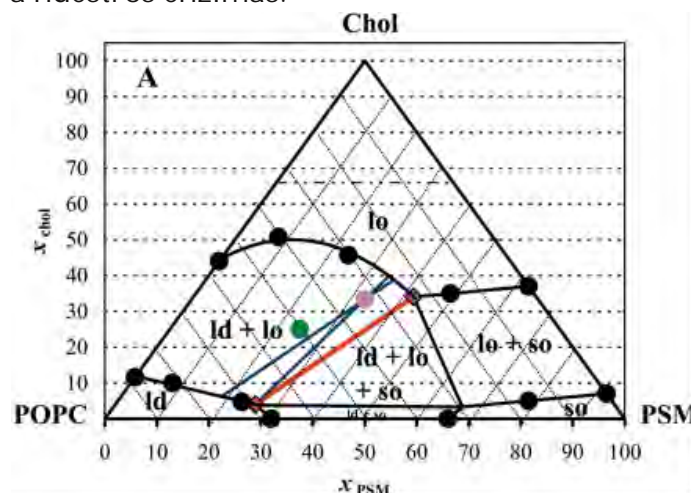


Figura 3. Diagrama de fases triangular para la mezcla esfingomiolina-fosfatidilcolina-colesterol con exceso de agua. Tomado de Goñi et al. (2008).

Bibliografía

- Adriá, F. 1997. Los secretos de El Bulli. Altaya, Barcelona. (Incluso si este libro no incluye las últimas genialidades del gran maestro, sí muestra muchos ejemplos de aplicación de instrumentos y técnicas químicas a la cocina).
- Busca Isusi, J.M. 1976. Cocinar a presión. 258 recetas. Magefesa, Bilbao. (Como parte de su testamento gastronómico, Busca Isusi nos legó este magnífico libro de recetas, utilizables con o sin olla a presión, que muestra sin lugar a dudas su erudición tanto como su pasión por la gastronomía).
- Cobb, V. 1972. Experimentos científicos que se pueden comer. Adara, La Coruña. (Es una pena que este libro, dirigido a niños y jóvenes, esté descatalogado. Sería

mi texto preferido para un curso de física y química a nivel escolar).

- Goñi, F.M., Alonso, A., Bagatolli, L.A., Brown, R.E., Marsh, D., Prieto, M., Thewalt, J.L. 1988. Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 665-684.
- Kurti, N. y Kurti, G. (eds.). 1988. *But the crackling is superb*. Adam Hilger, Bristol. (Se trata de un libro basado en contribuciones de Fellows of the Royal Society de lectura amenísima. Hay muchos comentarios de ciencia aplicada a la cocina. En este libro se encuentra, en pp. 18-22, la contribución de E. Lester Smith sobre los diagramas de fases).
- Kurti, N. y This-Benkhardt, H. 1994. Química y física de la cocina. *Investigación y ciencia*, junio:40-45. Apéndice en pp. 83-85. (Una breve e interesante introducción al tema, con un apéndice experimental).
- Ugalde, U., Lasa, D. y Adúriz, A.L. 2009. *Las primeras palabras de la cocina*. IXO editorial, San Sebastián. (Esta obra de nuestro consocio Unai Ugalde incluye numerosos ejemplos de cómo la ciencia y la tecnología de laboratorio encuentran una admirable aplicación en la cocina).



Félix M. Goñi Urcelay es catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea y Director de la Unidad de Biofísica, centro mixto CSIC-UPV/EHU.

Nacido en Donostia-San Sebastián en 1951. Es Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Navarra (1975). Realizó estudios postdoctorales en la Universidad de Londres (Royal Free Hospital, Prof. D. Chapman). En 1978, se incorporó a la Facultad de Ciencias de Leioa, Bizkaia, como profesor adjunto de Bioquímica, y comenzó a desarrollar lo que luego sería el Grupo de Biomembranas, y, a partir de 1999, la Unidad de Biofísica. Su grupo es uno de los grupos de alto rendimiento del Gobierno Vasco y de la UPV/EHU. Su trabajo de investigación se centra en las interacciones moleculares en las membranas celulares. Ha publicado 6 libros y 302 artículos e impartido numerosas conferencias invitadas y plenarias en todo el mundo. Es coautor de 5 patentes y ha dirigido 16 tesis doctorales. Es miembro de los Consejos Editoriales de *Journal of Liposome Research*, *Biochimica et Biophysica Acta*, *Chemistry and Physics of Lipids* y *Chemical Biology*. También es miembro del Comité de Redacción de *Revista de Derecho y Genoma Humano* y ha formado parte del comité científico de un buen número de congresos internacionales. En 2002 fue Experto de la Comisión del Programa de Biología Fundamental del Ministerio de Educación y Ciencia. Fue Presidente del Comité del Programa del 51st Annual Meeting of the Biophysical Society (2006), Baltimore, Maryland, USA.

En cuanto a cargos de gestión ha sido Director de Política Científica, Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco y desde 2006 es Presidente del Comité de Publicaciones de FEBS (Federation of European Biochemical Societies) y también Fundador y Presidente de la Fundación Biofísica Bizkaia/Biofisika Bizkaia Fundazioa. Es premio Euskadi de Investigación otorgado por el Gobierno Vasco en 2002 y Amigo de Número de la Real Sociedad Bascongada de Amigos del País (2003) y Profesor Honorario de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (2005).



PONIENDO EN CLARO

Nuevas terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer

José Manuel Jiménez Heras¹, Laura Lindo Yugueros², Laura Maeso Alonso³, Daniel Martínez Manuel⁴, Lorena Mata Gómez⁵, Ana Pariente Delgado⁶, Cayetano Pleguezuelos Manzano⁷, Israel Prada García⁸, Pablo Prieto Fuertes⁹, Patricia Primo Arias¹⁰, Ignacio Prusen Mota¹¹, Gabriel Ramírez Nieto¹², Daniel Roca Lema¹³, Sonia Sánchez Bezanilla¹⁴, Natalia Sanz Gomez¹⁵, Eider Valle Encinas¹⁶, Roberto Vázquez Fernández¹⁷, Cristina Vega Carbajal¹⁸, Paloma Vicario Sánchez¹⁹, Lucía Villamañán de Santiago²⁰, Irene Villar Rúa²¹, María C. Marín²²

Facultad de C. C. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. 1-21Alumnos de 2º curso de Biotecnología. *Todos los alumnos han contribuido de manera idéntica en la elaboración de este artículo. 22 Profesora de la asignatura Biología Celular. (Curso 2011-2012).

1. jjimeh00@estudiantes.unileon.es; 2. llindy00@estudiantes.unileon.es; 3. lmaesa00@estudiantes.unileon.es; 4. dmartm01@estudiantes.unileon.es; 5. lmatag00@estudiantes.unileon.es; 6. aparid00@estudiantes.unileon.es; 7. cplegm00@estudiantes.unileon.es; 8. ipradg00@estudiantes.unileon.es; 9. pprief00@estudiantes.unileon.es; 10. pprima00@estudiantes.unileon.es; 11. iprusm00@estudiantes.unileon.es; 12. gramin00@estudiantes.unileon.es; 13. drocal00@estudiantes.unileon.es; 14. ssanbc00@estudiantes.unileon.es; 15. nsanzg00@estudiantes.unileon.es; 16. evalle00@estudiantes.unileon.es; 17. rvazqf00@estudiantes.unileon.es; 18. cvegac00@estudiantes.unileon.es; 19. pvicas00@estudiantes.unileon.es; 20. lvilld00@estudiantes.unileon.es; 21. ivillr00@estudiantes.unileon.es; 22. carmen.marin@unileon.es.

El cáncer es el término que se utiliza para englobar un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento descontrolado de células alteradas molecularmente por mutaciones o modificaciones epigenéticas. Estas alteraciones tienen como consecuencia la des-regulación de los mecanismos de señalización y control que mantienen la homeostasis celular. Los tratamientos contra el cáncer pretenden erradicar el tumor primario, así como tumores secundarios, metástasis, que surgen en diversas partes del cuerpo. La mayoría de los fármacos usados como quimioterapéuticos son sustancias citotóxicas que matan preferentemente, pero no de manera exclusiva, células que se están dividiendo activamente. Debido a la gran toxicidad de estos tratamientos, hoy en día la búsqueda de nuevos fármacos se centra en la obtención de terapias dirigidas. Las terapias dirigidas son fármacos que bloquean el crecimiento y diseminación del cáncer interfiriendo específicamente con moléculas de señalización o control, denominadas dianas moleculares. Se espera que estos fármacos, específicos para los cambios moleculares de las células cancerosas, sean más efectivos y menos tóxicos y ofrezcan a los médicos la posibilidad de personalizar el tratamiento contra el cáncer para cada paciente. En la presente revisión describimos algunas terapias dirigidas que se están utilizando actualmente en clínica.



Palabras clave

Quimioterapia, dianas moleculares, anticuerpos terapéuticos, inhibidores de kinasas, inhibidores de mTor, apoptosis, receptores tirosina kinasa.

Introducción

Las terapias dirigidas son nuevos tratamientos basados en sustancias contra dianas moleculares específicas de las células cancerosas. Para diseñar estas terapias es necesario un conocimiento profundo de los eventos moleculares que han producido la transformación celular, para poder identificar las dianas moleculares contra las cuales dirigir dicha terapia. Estas terapias interfieren con distintos procesos celulares como la proliferación, el crecimiento, la muerte y la diseminación de la célula tumoral. Muchas de estas terapias se concentran en proteínas asociadas con las vías de señalización celular, las cuales forman un sistema complejo de comunicación que rige las actividades y funciones básicas de la célula, como la división celular, el movimiento de las células, la reacción de las células a estímulos externos específicos y hasta la muerte celular.

Muchas de las terapias dirigidas han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de tipos específicos de cáncer. Otras, se investigan en ensayos clínicos y en pruebas preclínicas (estudios de investigación con animales).

En la presente revisión, describimos algunas terapias dirigidas que se están utilizando actualmente en clínica: anticuerpos terapéuticos como Herceptin y Mapatumumab, o moléculas inhibitoras de kinasas citosólicas (Gleevec) o de kinasas reguladoras del control transcripcional del metabolismo (Everolimus).

Anticuerpos terapéuticos contra el cáncer de mama: Herceptin

La mayoría de las terapias dirigidas pueden ser anticuerpos monoclonales. Un ejemplo clásico de estos es el Herceptin (conocido también como Avastin o Trastuzumab). Este fármaco es un anticuerpo monoclonal antagonista (inactivante) contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), denominado (HER2 o EGFR), y es efectivo en el 15-25% de las cánceres de mama que sobreexpresan dicho receptor.

Vía de señalización EGF-HER2/Ras/MAPK

Para comprender el funcionamiento de Avastin, debemos hablar del receptor al cual se une e inactiva, Her2. Este receptor pertenece a la familia de receptores de membrana tirosin kinasa del EGF, en humanos HER (Human EGF receptors), los cuales tras ser activados por su ligando transmiten la señal de proliferación celular recibida. Esta activación de la función kinasa requiere el

reconocimiento del ligando, dimerización de receptores y la fosforilación cruzada de estos. Esta fosforilación del dominio intracelular de los receptores, generará una zona de reconocimiento y anclaje donde se formarán complejos de señalización que pondrán en marcha una vía de señales complejas e interrelacionadas cuya consecuencia es la proliferación celular (Fig. 1).

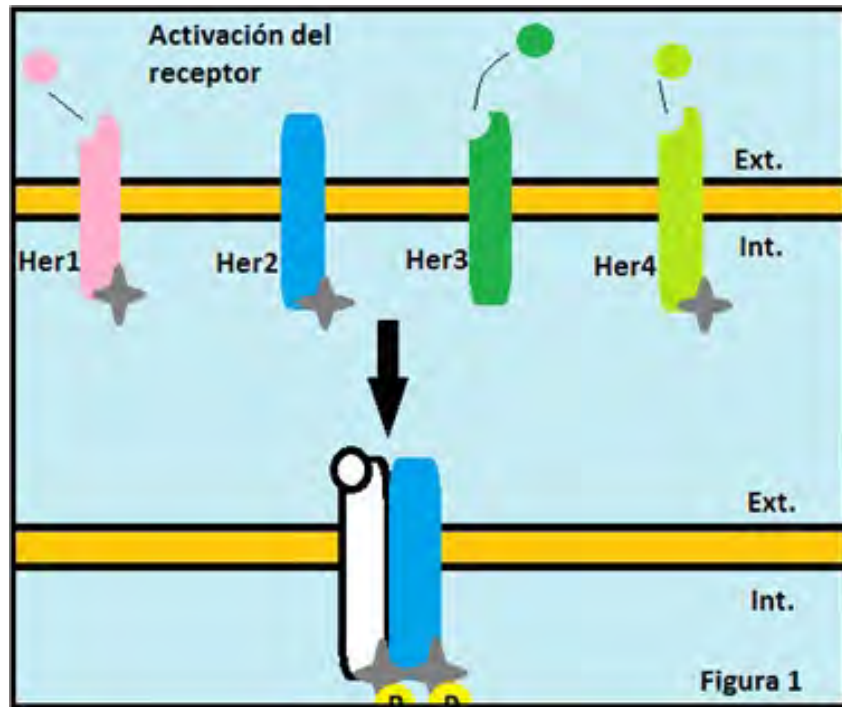


Figura 1. Esquema de la fosforilación de los receptores HER.

Los receptores HER activados van a reclutar proteínas adaptadoras, como GRB2, que se une a los dominios fosforilados del receptor y permiten la activación de la proteína Ras, un interruptor molecular que va a modular la respuesta celular a factores de crecimiento y otros estímulos celulares (Fig. 2).

Ras pertenece a una familia de proteínas con capacidad de unirse e hidrolizar el GTP, por eso se las denomina proteínas G monoméricas. La unión de estas proteínas al GTP está facilitada por un factor intercambiador de nucleótidos (GEF), denominado SOS. SOS contiene unos dedos de Arginina que actúan sobre la proteína Ras unida al GDP (inactiva), abriendo el sitio de unión para el GDP/GTP. El GDP sale, intercambiándose por el GTP presente en el citoplasma, el cual entra a favor de gradiente. De esta manera Ras es activada.

Cuando Ras se encuentra en estado activo puede activar a múltiples proteínas, denominadas efectoras de Ras, desencadenando múltiples vías de señalización celular; por eso se dice que Ras es un distribuidor de señales. La activación de Ras por factores de crecimiento, como el EGF, induce la proliferación celular. Esta respuesta celular es mediada por una vía de señalización citoplasmática denominada de las MAP kinasas (Mitogen activated

protein kinases, MAPKs). Esta vía está constituida por un grupo de tres quinasas (RAF, MEK y ERK) que van a activarse consecutivamente por fosforilaciones encadenadas (Fig. 2). ERK fosforilada forma dímeros, los cuales son trasladados al núcleo. Una vez en el núcleo, fosforila factores de transcripción que activarán la transcripción de genes de respuesta primaria o temprana. Estos genes, llamado Fos y Jun, son a su vez factores de transcripción, los cuales activarán genes como Myc. Myc activa genes que codifican para proteínas que regulan el ciclo celular como la ciclina D1, necesaria para que la célula quiescente active la síntesis de su DNA (fase S del ciclo celular) y comience así el ciclo celular y la posterior entrada en mitosis.

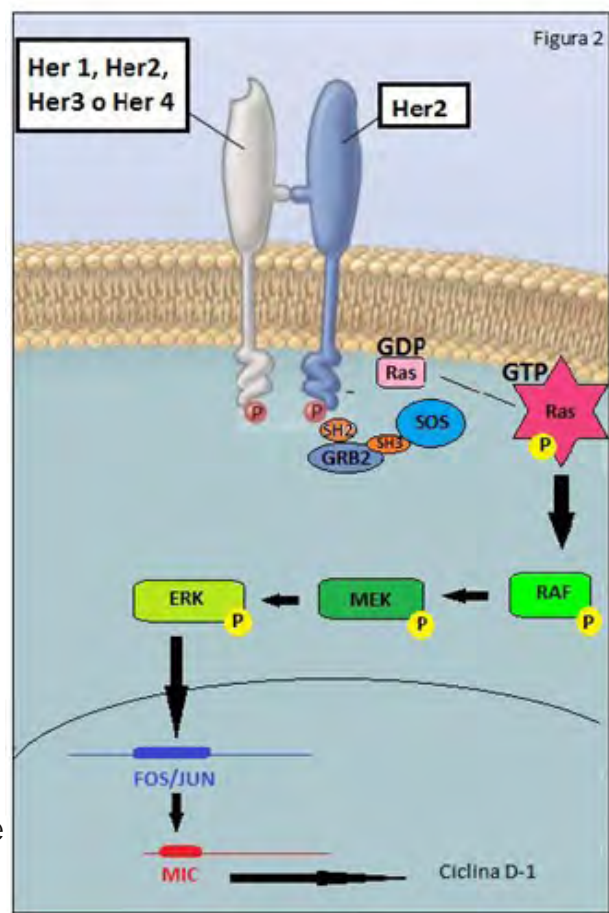


Figura 2. Esquema de la ruta de las MAP quinasas.

Cuando Ras se encuentra en estado activo puede activar a múltiples proteínas, denominadas efectoras de Ras, desencadenando múltiples vías de señalización celular; por eso se dice que Ras es un distribuidor de señales. La activación de Ras por factores de crecimiento, como el EGF, induce la proliferación celular. Esta respuesta celular es mediada por una vía de señalización citoplasmática denominada de las MAP quinasas (Mitogen activated protein kinases, MAPKs). Esta vía está constituida por un grupo de tres quinasas (RAF, MEK y ERK) que van a activarse consecutivamente por fosforilaciones

encadenadas (Fig. 2). ERK fosforilada forma dímeros, los cuales son traslocados al núcleo. Una vez en el núcleo, fosforila factores de transcripción que activarán la transcripción de genes de respuesta primaria o temprana. Estos genes, llamado Fos y Jun, son a su vez factores de transcripción, los cuales activarán genes como Myc. Myc activa genes que codifican para proteínas que regulan el ciclo celular como la ciclina D1, necesaria para que la célula quiescente active la síntesis de su DNA (fase S del ciclo celular) y comience así el ciclo celular y la posterior entrada en mitosis.

Los receptores HER también regulan la supervivencia celular mediante la activación de la vía de fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K), la cual se describirá más adelante (ver Figs. 3 y 4), inhibiendo de esta manera la apoptosis o muerte celular.

¿Por qué se utiliza el receptor HER2 como diana molecular para la terapia dirigida en el cáncer de mama?

En torno al 30% de las células de carcinoma de mama presentan una sobreexpresión del receptor Her2. Este receptor está en la membrana plasmática en forma pre-activada, pudiendo heterodimerizar con otros receptores que sí han sido activados por ligando y transducir esta señal. Al ser Her2 un receptor no dependiente de ligando, su dimerización permitirá la activación de la señalización con cantidades mínimas de ligando, e incluso, en ausencia de este. Es decir, la sobreexpresión de esa proteína en las células tumorales tendrá como resultado una transducción mayor de señales de proliferación y de supervivencia, características ambas de las células cancerosas.

Aquí entra en juego Herceptin, un anticuerpo monoclonal que se une de manera específica y antagónica al dominio extracelular de HER2. Esta unión inhibe la dimerización de HER2 con otros receptores, y por tanto, la vía de señalización antes descrita y la proliferación que esta induce.

Utilización de Herceptin en clínica

Este fármaco solo debe ser utilizado en los casos en los que se ha demostrado la sobreexpresión de HER2. Ha sido utilizado en el tratamiento del cáncer de ovario, de pulmón, adenocarcinoma gástrico y cáncer de mama; siendo este último en el que se encontró un mayor éxito y en el que se han basado la mayoría de las investigaciones sobre esta terapia dirigida. Uno de los avances clínicos más relevantes del pasado año ha sido la demostración de que Herceptin en combinación con quimioterapia reduce en un 52% la progresión del cáncer ovárico, tanto recurrente como de nuevo diagnóstico.

A pesar de los resultados positivos obtenidos con el tratamiento de Herceptin, hay un porcentaje importante de pacientes que no responden al

fármaco. La resistencia puede derivar de la activación de una vía alternativa de señalización, por ejemplo la activación constitutiva de Ras, frecuente en tumores humanos. Debido a esto, se hace necesaria su combinación con otros fármacos como docetaxelo, anastrozol.

Moléculas inhibitoras dirigidas contra el regulador transcripcional del metabolismo celular mTor: Everolimus

La función de mTOR integra la regulación entre el crecimiento (en masa) y la proliferación celular, controlando el metabolismo celular mediante la inducción de la transcripción de genes metabólicos. Esto hace a mTor una diana ideal para terapia dirigida, y por ello, fármacos inhibidores de mTOR como la rapamicina y sus derivados (Everolimus), pueden tener especial relevancia terapéutica.

Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR

mTOR es una proteína kinasa presente en la mayoría de las células y evolutivamente muy conservada. Está implicada en una compleja vía de señalización que estimula el crecimiento y proliferación celular, integrando diferentes señales relacionadas con la disponibilidad de nutrientes o el nivel energético. La mTOR es una gran proteína multidominio, dividida en dos complejos. El complejo de mTor 1 (conocido como mTORC1) es el mayor de los dos complejos y controla la síntesis de proteínas, lo que lleva a la angiogénesis (a través de la vía VEGF), la progresión del ciclo celular y el crecimiento celular, la adipogénesis y el metabolismo celular. El complejo también conduce a la inducción de la autofagia.

Como explicamos anteriormente (Fig. 3), los receptores de membrana para distintos factores de crecimiento, tales como la insulina, el EGF o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al unirse a su ligando se activan, y son capaces, a su vez, de activar la PI3K.

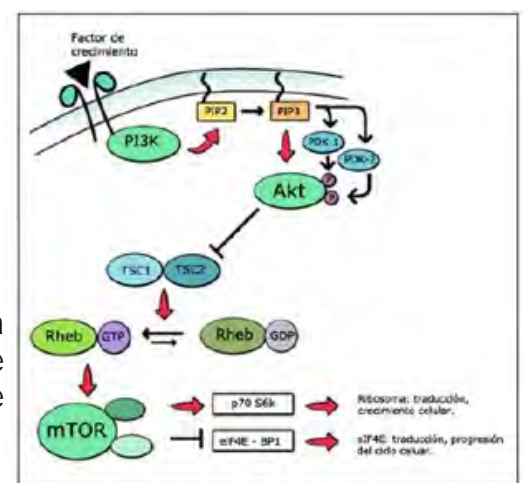


Figura 3. Esquema de señalización de la PI3K mediante la unión de receptores de membrana a distintos factores de crecimiento.



La PI3K fosforila moléculas de fosfatidilinositol bisfosfato (PIP2) en la cara interna de la membrana plasmática para generar fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), creando un sitio de anclaje para la fosforilación de la quinasa Akt. Esta proteína kinasa es activada por PDK1 y PDK2, las cuales le transfieren grupos fosfato del PIP3 en residuos de serina y treonina específicos.

Akt activa desencadena una cascada de señalización que desactiva al complejo TSC1/TSC2, favoreciéndose el estado activo de la proteína G monomérica Rheb (Rheb-GTP). La proteína mTOR se encuentra activa cuando está unida a Rheb-GTP, por tanto la activación de Akt por la vía PI3K tiene como resultado la activación de mTOR (Fig. 3).

mTOR activa es capaz de fosforilar e inactivar una proteína, eIF4E-BP1, que actúa como inhibidor del factor de elongación eIF4E. La inhibición de eIF4E-BP1 permite la actividad del factor de elongación eIF4E, favoreciendo la traducción de proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular.

mTOR también puede activar la kinasa S6K (S6K1), que actúa sobre la proteína ribosomal S6 induciendo la síntesis proteica, y por tanto, estimulando el crecimiento celular (aumento en masa). Por otro lado, mTOR estimula la transcripción de genes, entre ellos los que codifican para proteínas ribosomales, con lo que se incrementa también por este camino el crecimiento celular.

¿Por qué se utiliza mTor como diana molecular para la terapia dirigida contra distintos tipos de tumores?

Las células tumorales se caracterizan, entre otras cosas, por presentar un metabolismo celular alterado que les permite un crecimiento y proliferación acelerados. En este sentido, la señalización a través de la vía de mTor suele estar incrementada de manera aberrante en la mayoría de los síndromes tumorales y cánceres esporádicos. Se ha demostrado que la activación de mTor es suficiente para inducir la glicolisis y activar el metabolismo oxidativo, además de activar la lipogénesis, procesos todos muy importantes en la biología del tumor. Además, la vía mTOR alterada produce un aumento descontrolado del crecimiento y proliferación celulares.

En el síndrome genético conocido como esclerosis tuberosa (TS), los pacientes presentan mutaciones en los genes TSC1 y TSC2 activadores directos de mTor (ver Fig. 3). Estos pacientes presentan múltiples tumores, inicialmente benignos, en distintos tejidos, entre ellos astrocitomas subependimarios de células gigantes (SEGA) en el cerebro.

Utilización de Everolimus en clínica

Everolimus es un inhibidor selectivo de mTOR. La inhibición de la vía de señales mTOR interfiere con la traducción y síntesis de proteínas reduciendo la



actividad de S6K1 y del factor de elongación eucariótico 4EBP-1, el cual, regula las proteínas implicadas en el ciclo celular, la angiogénesis y la glucólisis. Por tanto el Everolimus es un inhibidor potente del crecimiento y proliferación de las células tumorales.

El Everolimus se usa actualmente para tratar el carcinoma de células renales (RCC) avanzado. También se usa en pacientes con TS que presentan SEGA y en tumores cerebrales pediátricos. Recientemente la utilización de Everolimus en combinación con otros fármacos ha sido aprobada para tratar tumores pancreáticos neuroendocrinos ya que se ha demostrado que la combinación retrasa la progresión de estos tumores en un 50%.

Pequeñas moléculas inhibidoras de kinasas citoplásmicas contra la leucemia mieloide crónica (LMC): Gleevec

El Gleevec fue la primera terapia dirigida diseñada y utilizada. El diseño del Gleevec fue la consecuencia de un conocimiento profundo de los eventos moleculares que originan la leucemia mieloide crónica (LMC). La LMC es una de las neoplasias hematológicas humanas más frecuentes y la de peor pronóstico. Es una enfermedad bifásica. Primero cursa con una fase crónica, relativamente benigna, la cual desemboca irremediablemente en una crisis blástica letal. La enfermedad se define como un trastorno de naturaleza clonal con origen en una célula troncal hematopoyética (HSC) cuya característica molecular es el cromosoma Philadelphia (Ph1) el cual codifica la proteína de fusión con actividad kinasa, BCR-ABL. El Gleevec es una pequeña molécula inhibidora de la actividad kinasa de esta proteína.

¿Por qué se utiliza BCR-ABL como diana molecular para la terapia dirigida contra la LMC?

La génesis de la LMC se asocia, en el 95% de los casos, a una anomalía genética, el cromosoma Ph1, el cual es el resultado de la translocación de los cromosomas 9 y 22. En el cromosoma 22 se encuentra el gen Bcr, y en el cromosoma 9, el gen Abelson (Abl). Cuando una parte de este último gen se transfiere y se inserta dentro del gen Bcr, se origina el gen de fusión BCR-ABL.

La proteína de fusión generada, BCR-ABL, es una proteína con actividad tirosina kinasa citosólica que está activada constitutivamente debido a la pérdida de su secuencia reguladora durante la translocación. Esta activación constante tiene como consecuencia la alteración de determinadas vías de señalización celular como son los mecanismos que regulan la proliferación, muerte y diferenciación celular. La des-regulación conjunta de estos mecanismos celulares desemboca en la fase crónica de esta enfermedad.

La alteración de la regulación de la proliferación se debe a que la kinasa

BCR-ABL activa continuamente, y sin necesidad de ligando externo, la vía de las MAPK, antes mencionadas (Figs. 2 y 4). Esta activación constitutiva tiene como consecuencia una proliferación continua de las células progenitoras hematopoyéticas que poseen esta alteración.

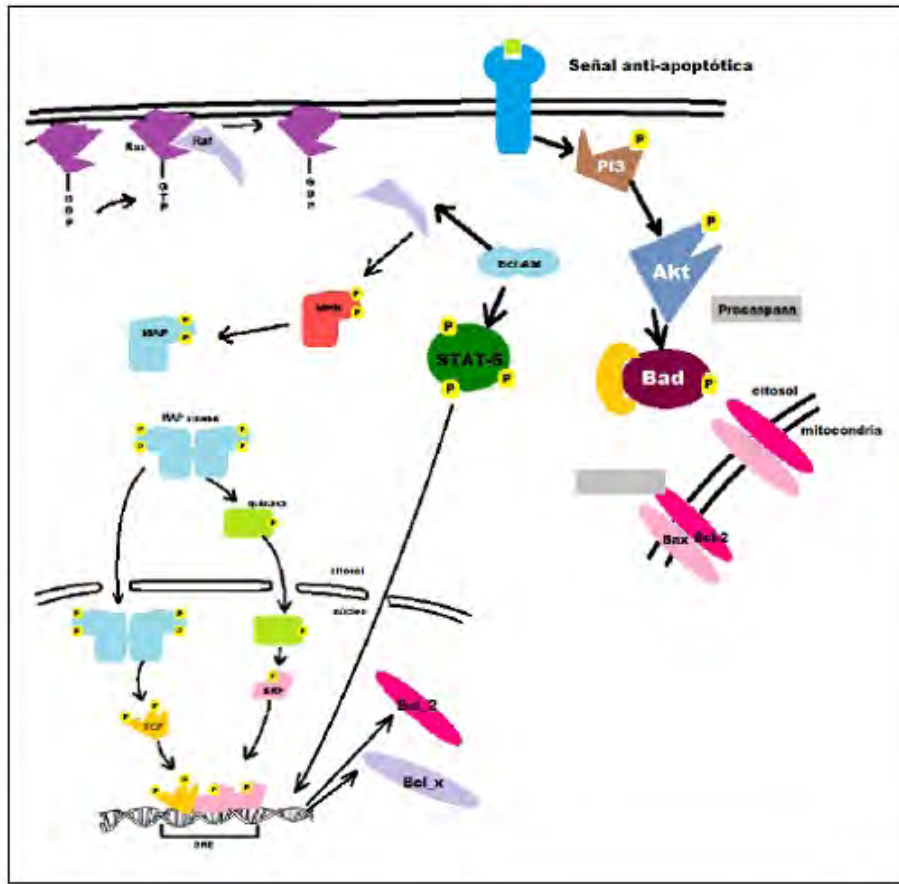


Figura 4. Vía de las MAPK, activada por BCR-ABL.

BCR-ABL también regula la supervivencia celular de las células progenitoras hematopoyéticas que lo expresan mediante la activación constitutiva de vías que inhiben la muerte celular o apoptosis.

La apoptosis se puede definir como una muerte celular programada efectuada por la actividad de unas proteasas, denominadas Caspasas. Estas caspasas se producen como zimógeno inactivo (pro-caspasa) y tienen que ser activadas por proteólisis. La apoptosis puede ser inducida por una vía intrínseca o vía mitocondrial, en la cual la activación de las Caspasas es dependiente de la liberación de Citocromo C de la mitocondria, o por una vía extrínseca, de la cual hablaremos más adelante.

La vía intrínseca de apoptosis se regula como un reostato que depende del equilibrio entre los niveles de proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bad o Bid) y anti-apoptóticas (Bcl-2 o Bcl-x). En condiciones óptimas para la supervivencia celular, los niveles de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 o Bcl-x son altos, por



lo cual estos formarán hetero-oligómeros con Bax, inhibiendo su función. Cuando la célula recibe una señal pro-apoptótica, se produce un incremento en la expresión de genes pro-apoptóticos, entre ellos Bax, permitiéndose la homo-oligomerización de estos. Los oligómeros Bax-Bax formarán poros en la membrana mitocondrial lo cual permite la salida de Citocromo-C al citoplasma. Este desencadena la activación de las caspasas mediadoras de la muerte celular programada.

Este balance pro-apoptótico se refuerza con la proteína Bad, la cual se une a Bcl-2 o Bcl-x, impidiendo la formación de hetero-oligómeros entre estos y Bax. Sin embargo, en una célula que recibe señales anti-apoptóticas se activa Akt y esta fosforila a Bad. Bad fosforilado es secuestrado al citoplasma y así incapacitado para unirse a Bcl2. Bcl2, ahora libre, es capaz de formar hetero-oligómeros con Bax impidiendo la formación de poros en la membrana mitocondrial y la salida del Citocromo-C al citoplasma, sin el cual las caspasas no pueden ser activadas y la célula sobrevive (Fig. 4).

BCR-ABL regula la muerte/supervivencia celular mediante la activación constitutiva de la enzima PI3K. La activación de esta enzima resulta en la fosforilación y activación de Akt, la cual fosforila múltiples dianas citoplásmicas. Entre ellas, la proteína pro-apoptótica Bad, inactivándola. Por tanto, en células que expresan BCR-ABL la fosforilación inhibitoria de Bad tiene como consecuencia la inhibición de la vía apoptótica intrínseca, y por tanto, incrementa la supervivencia de estas células (Fig. 4).

Así, en células progenitoras hematopoyéticas que expresan BCR-ABL la vía anti-apoptótica está activada constitutivamente tanto por la fosforilación inhibitoria de Bad, como por la transcripción excesiva de genes anti-apoptóticos, teniendo como consecuencia la resistencia a estímulos pro-apoptóticos. Esto, junto al incremento en la proliferación de estas células, resulta en un excesivo número de células mieloides en todos los estadios de maduración.

Diseño del Gleevec y su utilización en clínica

A principios de los 90, Brian Druker, Nicholas Lydon y Charles Sawyers se centraron en la búsqueda de un inhibidor molecular que se encargase de bloquear la actividad kinasa de BCR-ABL. Identificaron una molécula, denominada STI-571, Imatinib o Gleevec, capaz de bloquear la unión de ATP al sitio catalítico de BCR-ABL, evitando así la fosforilación y consecuente activación de la misma (Fig. 5). Este fármaco conseguía inhibir la proliferación de las células tumorales tanto in vitro como in vivo. Así, Gleevec no solo inhibe la proliferación celular, sino que induce a la apoptosis de las células tumorales sin afectar a las normales, carentes de esta proteína de fusión.

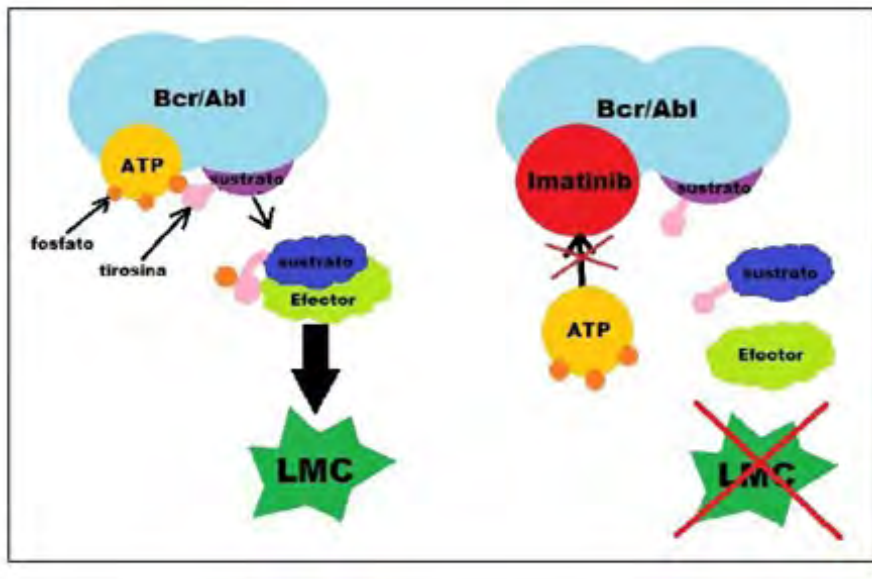


Figura 5. Esquema de actuación del fármaco Gleevec.

Gleevec recibió aprobación de la FDA en mayo de 2001. El Gleevec demostró ser más efectivo que el tratamiento estándar anterior: -interferon y citarabina, aumentó el índice de supervivencia total a los 7 años para los pacientes con LMC a casi el 90%. Sin embargo se ha encontrado un inconveniente, la eficacia de Gleevec se reduce con el tiempo debido a adquisición de mecanismos de resistencia, en la mayoría de los casos debido a mutaciones del gen BCR-ABL. Las mutaciones se dan en dos categorías: una que comprende mutaciones situadas directamente en el sitio de unión del fármaco al sitio catalítico y que evitan la unión, y otra que engloba a aquellas que se encuentran dispersadas a lo largo de la proteína y que podrían alterar la flexibilidad de la enzima BCR-ABL, bloqueando la entrada al Gleevec.

Para evitar este tipo de resistencias se han diseñado nuevos medicamentos similares a Gleevec como el Dasatinib o el Nilotinib. Ensayos clínicos de tratamientos con Dasatinib y Nilotinib como tratamientos de primera línea para la LMC, han demostrado que estos producen respuestas más rápidas y son más eficaces en un número mayor de pacientes en comparación con el Gleevec.

Terapias dirigidas que inducen apoptosis en células tumorales: Mapatumumab

Una estrategia obvia para eliminar células tumorales es la inducción de apoptosis o muerte celular en las mismas. De hecho, la característica común de los cánceres curables, como el cáncer testicular, el teratocarcinoma, o ciertas leucemias, es que son sensibles a la inducción de apoptosis. Sin embargo, como se apuntaba anteriormente, la mayoría de las células tumorales son resistentes a

la inducción de apoptosis por agentes quimioterapéuticos. Por tanto la búsqueda de terapias dirigidas capaces de inducir apoptosis, de manera específica en células tumorales, es un objetivo importante en la industria farmacéutica. Un ejemplo del resultado de esta búsqueda es el Mapatumumab, un anticuerpo monoclonal agonista (induce la respuesta) del receptor de la muerte, TRAIL, que induce la muerte de células tumorales.

Como se comentó anteriormente, la apoptosis puede ser inducida por una vía intrínseca, o por una vía extrínseca, caracterizada por ser independiente de Citocromo C y activada mediante la unión de un ligando extracelular (señal pro-apoptótica) a los llamados receptores de la muerte.

La familia de receptores de la muerte incluye los receptores de ligandos como Fas, TNF (factor de necrosis tumoral) o TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Los miembros de esta familia están caracterizados por poseer un dominio intracelular denominado dominio de muerte (death domain, DD). Una vez unido el ligando al receptor se produce la oligomerización de receptores y la formación de un complejo de señalización inductor de muerte (death-inducing signalling complex, DISC) junto a proteínas adaptadoras, como TRADD o FADD. La procaspasa-8 inactiva es reclutada por FADD al complejo DISC, y por proximidad de varias moléculas, la actividad proteasa intrínseca de esta procaspasa es suficiente para cortar algunas moléculas y producir la caspasa-8 activa. Esta es liberada del DISC al citoplasma donde por proteólisis activará la procaspasa-3 (Fig. 6). La Caspasa-3 es la última responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos resultando en la muerte celular.

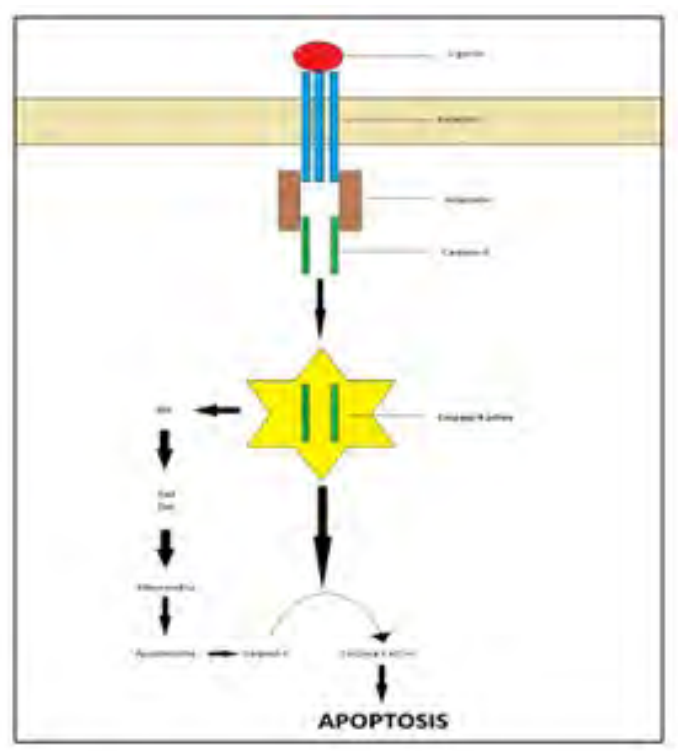


Figura 6. Esquema de la activación de la procaspasa-3 en el citoplasma.



¿Por qué se utiliza TRAIL como diana molecular?

La activación de la vía intrínseca suele estar bloqueada en células tumorales por diversas alteraciones genéticas como falta de p53, activación constitutiva de Akt, sobreexpresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2, etc. Sin embargo, las células tumorales son mucho más sensibles a la muerte inducida por TRAIL que las células normales. Esto se debe a que las células normales, pero no las tumorales, producen un receptor "señuelo" que carece de dominio DD citosólico. Estos receptores señuelo pueden unirse a TRAIL pero no transducir su señal de muerte al interior celular. Estos datos sugieren que la activación de la vía extrínseca de la apoptosis por TRAIL podría ser una terapia dirigida específica para células tumorales.

Diseño del Mapatumumab y su utilización en clínica

El Mapatumumab es un anticuerpo monoclonal agonista humano que induce directamente la muerte de células tumorales. Este fármaco reduce la viabilidad de múltiples tipos de células tumorales in vitro e induce la activación de las caspasas 8 y 3, indicando que la activación de los receptores TRAIL es suficiente para inducir apoptosis.

La administración in vivo de Mapatumumab dio lugar a una rápida regresión del tumor o a la represión del crecimiento tumoral en cáncer de pulmón no microcítico (conocido como cáncer de pulmón de células no pequeñas) y en tumores renales en modelos de xenoinjerto (heteroinjerto procedente de otra especie).

Tal y como demuestran los experimentos realizados, esta vía es una de las más prometedoras en la lucha contra el cáncer. Sin embargo, se necesita una mayor experimentación y estudio, y se mantienen expectativas de futuro en la combinación de varios fármacos para conseguir un mayor efecto, explotando ambas vías (intrínseca y extrínseca).

En resumen, podemos decir que las terapias dirigidas contra el cáncer ofrecen la posibilidad de personalizar el tratamiento del cáncer en función de las alteraciones moleculares presentes en cada paciente. Además, son tratamientos, en principio, más selectivos por lo que se reducen los efectos secundarios y se mejora la calidad de vida.

Sin embargo, las terapias dirigidas muestran ciertas limitaciones, siendo la principal el desarrollo de resistencias a estas terapias. Es por esto que se propone el uso de estas terapias dirigidas administradas en combinación con otras terapias dirigidas y/o en combinación con otros tratamientos tradicionales del cáncer.



Bibliografía

- Artigas, C.G., Melo, A. et al. 2003. Transcritos de fusión del gen bcr-abl en pacientes con leucemia mieloide crónica. *International Journal of Morphology*. 21:205-209.
- Bumbea, H., Vladareanu, A.M. et al. 2010. Chronic myeloid leukemia therapy in the era of tyrosine kinase inhibitors - the first molecular targeted treatment. *Journal of Medicine and Life*. 3:162-166.
- Cervantes F. 2008. Leucemia mieloide crónica. *Medicina Clínica*. 131:658-659.
- Cohen, M.H., Moses, M.L. et al. 2002. Gleevec for the treatment of chronic myelogenous leukemia: US. Food and Drug Administration regulatory mechanisms, accelerated approval, and orphan drug status. *Oncologist*. 7:390-392.
- Daley, G.Q. 2003. Gleevec resistance: lessons for target-directed drug development. *Cell Cycle*. 2:190-191.
- Fakler, M., Loeder, S., et al. 2009. Small molecule XIAP inhibitors cooperate with TRAIL to induce apoptosis in childhood acute leukemia cells and overcome Bcl-2-mediated resistance. *Blood*. 113:1710-1722.
- Gaestel, M., Mengel, A. et al. 2007. Protein kinases as small molecule inhibitor targets in inflammation. *Current Medicinal Chemistry*. 14:2214-2234.
- Guertin D.A. y Sabatini D.M. 2005. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 11:353-361.
- Guertin, D.A. y Sabatini, D.M. 2007. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*. 12:9-22.
- Hail, N., Carter, B.Z, Konopleva, M. y Andreeff, M. 2006. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis*. 11:889-904.
- Lowe, S.W. y Lin, A.W. 1999. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 21: 485-495.
- Nagar, B. 2007. c-Abl tyrosine kinase and inhibition by the cancer drug imatinib (Gleevec/STI-571). *Journal Nutrition*. 137:1518S-1523S; discussion 1548S.
- Neviani, P., Santhanam, R. et al. 2007. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*. 117:2408-2421.
- Olayioye, M.A. 2001. Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Research*. 3:385-389.
- O'Reilly, T., Vaxelaire, J., Muller, M. et al. 2002. In vivo activity of RAD 001, an orally active rapamycin derivative, in experimental tumor models. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*. 43:Abstr 359.



- Pukac, L., Kanakara, P., et al. 2005. HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *British Journal of Cancer*. 92:1430-1441.
- Schmitt, C.A. y Lowe, S.W. 1999. Apoptosis and therapy. *Journal of Pathology*. 187:127-137.
- Schuler, W., Sedrani, R., Cottens, S. et al. 1997. SDZRAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation*. 64:36-42.



SIGUIENDO LA PISTA

Descomposición de la capa de hojarasca de diferentes especies perennifolias y caducifolias

Irantzu Anzar Martínez de Lagrán¹, Beatriz de Arriba Ruiz², Beatriz Barrera Garmón³, Álvaro Campón Sánchez⁴, Raquel Carballo Castosa⁵, Sandra E. Ciudad Broncano⁶, Cristina Díaz Payno⁷, Rocío García Gómez⁸, Jesús Gil Pulido⁹, Diego Herrero Alonso¹⁰

Facultad de C. C. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. Alumnos de 5º curso de Biotecnología (curso 2011-2012).

1. btciam00@estudiantes.unileon.es; 2. btcbda00@estudiantes.unileon.es; 3. btcbbg00@estudiantes.unileon.es; 4. btcac00@estudiantes.unileon.es; 5. btcrcc00@estudiantes.unileon.es; 6. btsec00@estudiantes.unileon.es; 7. btccdp00@estudiantes.unileon.es; 8. btcrgg00@estudiantes.unileon.es; 9. btcjgp00@estudiantes.unileon.es; 10. btcdha00@estudiantes.unileon.es.

Las hojarascas de las especies caducifolias y perennifolias presentan procesos diferenciales de descomposición, debidos, en gran parte, a las diferencias en su composición química. El lixiviado es la primera de las etapas de descomposición. En esta etapa se liberan los materiales solubles presentes en las hojas. En el siguiente trabajo se ha llevado a cabo un experimento para determinar si existen diferencias significativas en el lixiviado de componentes entre hojas pertenecientes a especies caducifolias (*Juglans regia* y *Quercus pyrenaica*) y perennifolias (*Quercus ilex* y *Pinus sylvestris*). Se discutirá la relación entre esta diferencia y la composición de los dos tipos de hoja.

Palabras clave: Lixiviación, descomposición, caducifolias, perennifolias, polifenoles, ceras.

Introducción

El flujo de energía a través de los sistemas se basa en el carbono. Comienza con la fijación del CO₂ como carbono orgánico simple en el proceso de producción primaria; luego es transportado a través de la cadena trófica, para finalizar nuevamente en la atmósfera a través del proceso de respiración celular (Dajoz, 2001).

Sin embargo, la producción primaria depende de la absorción por parte de las plantas de un conjunto de nutrientes minerales esenciales (inorgánicos) y su incorporación a tejidos vivos. A modo general, la fuente de esos nutrientes esenciales es tanto la atmósfera, en el caso del carbono, como la meteorización de rocas y minerales. Una vez en el suelo o en el agua, son absorbidos por las plantas y, desde allí, se desplazan a través de la cadena trófica. De hecho, los nutrientes en forma orgánica, almacenados en los tejidos vivos, representan una

proporción significativa de nutrientes dentro del ecosistema. Cuando este tejido vivo llega a la senectud, los nutrientes vuelven al suelo en forma de materia orgánica muerta, y a partir de allí prosiguen su camino a través de la cadena trófica de los descomponedores (Lopez, 1991).

Uno de los procesos más importantes en los ecosistemas es la descomposición, por el cual la materia orgánica es transformada en sus componentes elementales. Esta descomposición se presenta en diferentes etapas: trituración, lixiviación, catabolismo y humificación (Álvarez-Sánchez, 2001), las cuales son reguladas por factores climáticos, las propiedades físicas del suelo, características químicas de los compuestos y la actividad de la biota del suelo. El catabolismo y la humificación requieren la colonización microbiana y la fragmentación por invertebrados. La humedad del suelo, el contenido de lignina y la concentración de nitrógeno y fósforo, permiten identificar los patrones temporales de descomposición.

La lixiviación es la eliminación abiótica de sustancias solubles como fenoles, carbohidratos y aminoácidos, debido al proceso de lavado por agua de lluvia de la hojarasca, mediante la cual se pierde hasta el 30% de la masa original de las hojas, dependiendo de la especie. Es la primera etapa de la descomposición y se completa en las primeras 24-48 horas. En el caso de la hojarasca, se lavan elementos inorgánicos como calcio, potasio y magnesio, y otros compuestos orgánicos, entre los que se encuentran ácidos orgánicos, proteínas y azúcares solubles. Estos son compuestos energéticos necesarios para los organismos, que posteriormente descompondrán compuestos recalcitrantes como ligninas y celulosa.

A diferencia del resto de procesos incluidos en la descomposición, la lixiviación es el único que no depende de la actividad microbiana. Sin embargo, depende de distintos factores, como son la absorción de agua por parte de la hojarasca y características morfológicas de la hojarasca (presencia de cutícula, espesor, etc.). Por otro lado, existe una serie de factores ambientales que también influyen, como la presencia de oxígeno, los ciclos de luz y oscuridad, la lluvia, el aire y la temperatura.

Hasta el 30% del peso seco de la hojarasca se puede perder mediante el lixiviado de compuestos tanto inorgánicos como orgánicos en un periodo de cuatro meses, y entre ellos se encuentran compuestos orgánicos solubles en agua tales como polifenoles y ácidos fenólicos.

Se sabe que no todos los compuestos solubles en agua se lixivian con la misma facilidad. Entre los compuestos orgánicos, los carbohidratos son los primeros en lixiviar, pero la cantidad de compuestos solubles en agua que se lixivian varía con las especies (Petersen and Cummins, 1974, Ostrofsky, 1997, Margalef, 2004).



El objetivo de este trabajo es analizar las diferencias en el lixiviado de componentes entre hojas pertenecientes a distintas especies arbóreas. El estudio se llevó a cabo en cuatro especies, dos caducifolias y otras dos perennifolias, que se detallan a continuación.

El pino albar (*Pinus sylvestris*) presenta en la composición de la hoja perennifolia como principales elementos el calcio (420,32 mg/ 100 g de peso seco), potasio (410,23 mg/100g de de peso seco) y magnesio (125,33 mg/100g de peso seco), seguidos por otras compuestos orgánicos específicos tales como ácidos benzoicos (61% de los compuestos orgánicos), ácidos cinámicos (27 % de los compuestos orgánicos) y algunos fenoles (13% de los compuestos orgánicos) (Nykqvist, 1963, McTiernana et al., 2003).

El nogal (*Juglans regia*) es un árbol caducifolio de la familia de las juglandáceas. En la composición de las hojas del nogal destaca la presencia de naftoquinonas -como la juglona (5-hidroxil- 1,4- naftoquinona)- y los carotenos. Por otra parte, se encuentran taninos (4% peso seco) que otorgan a las hojas varias propiedades antioxidantes. La vitamina principal en la hoja es la B1 y, la composición en fenoles corresponde al 0,1% del peso total. También podemos encontrar algunos ácidos, como el ascórbico (1-5% del total de la hoja), fenolcarboxílico, gálico, cafeico y el ácido neoclorogénico, así como derivados flavónicos, además de hiperósidos, juglanina, quercetina, hiperina (0,2% del peso total) y arabinosa. Aunque los compuestos en mayor proporción en la hoja son los terpenos y los ácidos grasos, en conjunto, una alta proporción del peso seco corresponde a iones como el hierro, el manganeso o el potasio y otros elementos como el nitrógeno que, en comparación con la composición de otras hojas de árboles se presentan con una abundancia mucho mayor (Drossopoulos et al., 1996, Pereira et al., 2007, Al-Riyami et al., 2009).

El roble (*Quercus pyrenaica*), tiene como principal componente en sus hojas el isopreno (2-metil-1 ,3-butadieno), que pertenece al grupo de los hidrocarburos orgánicos volátiles. Las hojas presentan elevado contenido de taninos, cuya concentración no es constante.

Aparecen dos tipos de taninos: taninos condensados (proantocianidina, cuya concentración aumenta con la madurez de la planta) y taninos hidrolizables (los galotaninos -que aparecen en primavera y se oxidan en verano- y los elagitaninos -que se degradan en otoño -, mayoritariamente en las hojas jóvenes). Por otro lado, las hojas de roble son muy ricas en azúcares, especialmente glucosa y fructosa, pero esta concentración se reduce durante el lixiviado, siendo más favorecida esta disminución en condiciones aeróbicas que anaeróbicas. Entre los ácidos, destacan el ácido málico y el ácido cítrico, aunque las hojas del roble poseen un menor contenido en dichos ácidos. Estos ácidos no son fáciles de lixiviar. El último componente importante de las hojas de roble

son los fenoles (Sabaté et al., 1995).

La encina (*Quercus ilex*) presenta hojas pequeñas y endurecidas, cubiertas de productos céreos que hacen que tenga una cutícula foliar con textura rígida y resistente. Además, la parte inferior de la hoja está cubierta de una pilosidad blanquecina. Otros componentes importantes de las hojas de encina son los monoterpenos (α -pineno, β -pineno, sabineno, mirceno), sulfatos solubles y algunos metales como el cobre. Estas características de tamaño, de forma y de composición responden a una doble función: proteger al árbol de la deshidratación en verano, cuando en el bosque mediterráneo hace mucho calor y el agua es poco abundante, y proteger a la hoja de los fríos del invierno. Además, el árbol cierra los estomas de la hoja cuando los recursos hídricos son pobres. De este modo consigue una mayor economía de nutrientes. Construir todo el follaje representa un gran esfuerzo para un árbol que precisa tener muchos recursos a su alcance para conseguirlo, fundamentalmente agua. Una encina puede aprovechar los momentos favorables de un clima mediterráneo tan variable sin arriesgar tanto, ya que estas hojas, muy duras y coriáceas, evitan la excesiva transpiración de la planta, lo que le permite vivir en lugares secos y con gran exposición al sol, como la ribera mediterránea (Romane and Terradas, 1992, Castro-Díez et al., 1997).

Materiales y métodos

Para estudiar la lixiviación, se aplicó el siguiente protocolo para cada una de las especies (Fig. 1):

1. Se prepararon dos lotes diferenciados, cada uno con 4 réplicas, cada una de ellas constituida por unas 15 hojas que tenían un peso medio de entre 10 y 20 gramos.

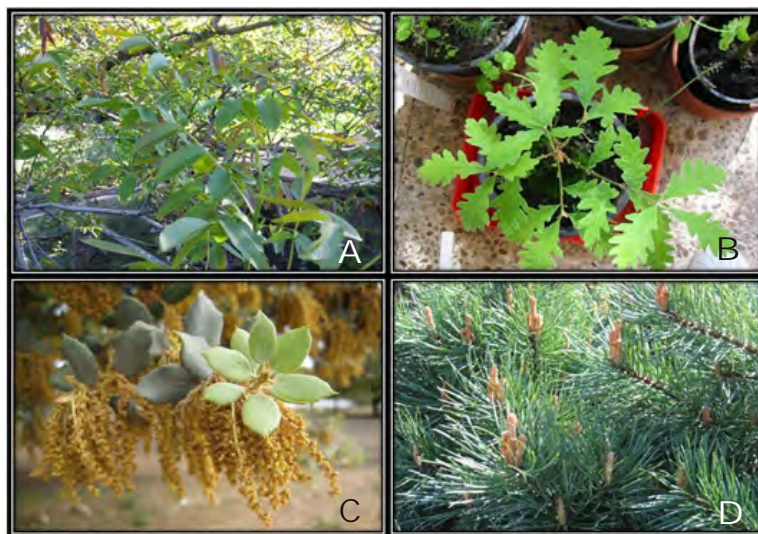


Figura 1. Detalle de las hojas de las especies utilizadas para el experimento. *Juglans regia* (A), *Quercus pyrenaica* (B), *Quercus ilex* (C), *Pinus sylvestris* (D).

2. El lote 1 se utilizó para calcular el peso seco medio por réplica de las hojas mediante su deshidratación en estufa durante 48 horas a 45°C (Fig.2). Con el peso fresco medio de las réplicas y el peso seco se calculó un parámetro que se denominó factor de corrección medio ((peso seco de las hojas/ peso húmedo de las hojas)*100).



Figura 2. Deshidratación de réplicas.

3. Las réplicas del lote 2 se sumergieron en agua del grifo para simular el proceso de lixiviación natural. Las hojas se encontraban agrupadas en réplicas en el interior de mallas. Se cambió a diario el agua del contenedor donde se sumergieron las muestras. Pasadas 72 horas, se sacaron las hojas de las mallas y se secaron en la estufa durante 48 horas a 45 °C (Fig.3). De esta manera se obtuvo el peso seco de cada réplica después de haber sufrido un proceso de lixiviación.



Figura 3. Proceso de lixiviación simulada.

4. Los pesos frescos de las réplicas del lote 2 se multiplicaron cada uno por el factor de corrección medio, para obtener el peso seco aproximado que tendría que tener la réplica después del secado. Estos datos se analizaron mediante un análisis estadístico "ANOVA" de una vía y se compararon las especies para ver si hay diferencias significativas en la descomposición por lixiviación entre caducifolias y perennifolias. Los análisis post hoc fueron Tukey con un nivel de significación de $p < 0.05$.

Resultados y discusión

La lixiviación es el primer paso en el proceso de descomposición de las hojas. Durante esta etapa, se produce una disminución de peso que corresponde con la pérdida principalmente de iones. La hipótesis que se quiere comprobar es si va a ser diferente entre hojas de especies arbóreas perennifolias y caducifolias.

La comparación se realiza en función del peso seco, por ello es necesario calcular el factor de correlación medio para poder comparar solamente la pérdida de peso en materia orgánica, determinándose que solo el 45% del peso fresco de la hoja corresponde a materia orgánica (resultados no mostrados). Este factor, multiplicado por el peso fresco de las hojas del lote 2 aporta el peso en materia orgánica aproximada que tendrían las mismas antes de ser sometidas al proceso de lixiviación.

Una vez calculado el peso seco de las hojas tras la lixiviación, se comprueba que hay una pérdida de peso diferencial entre las diferentes especies, siendo esta mayor en el caso de las especies caducifolias (Fig.4).

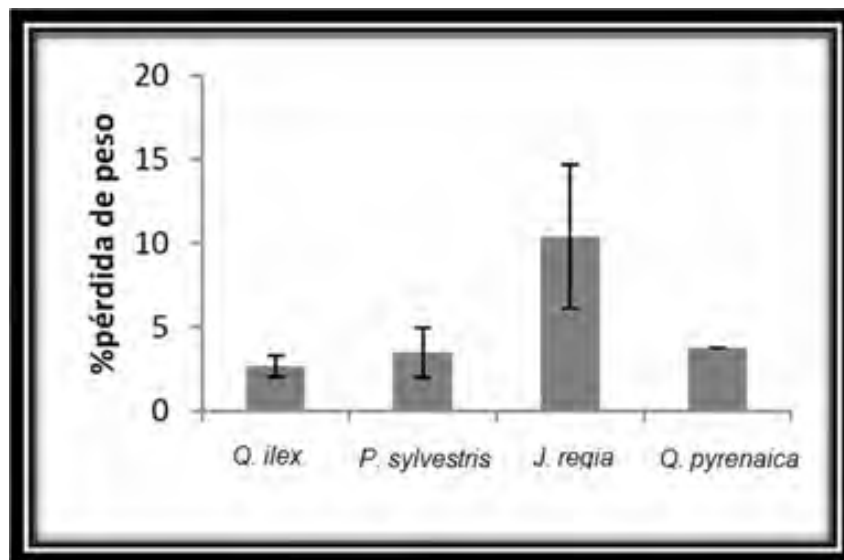


Figura 4. Porcentaje de materia orgánica perdido por lixiviación en las diferentes especies estudiadas. Se representa media \pm desviación estándar (n= 60)

Para la discusión vamos a obviar los resultados obtenidos para la especie *Quercus pyrenaica* debido a que un error en el proceso experimental hizo que de ella no se pudieran obtener datos concluyentes.

Se realiza un análisis ANOVA de una vía de las varianzas, obteniéndose un valor de "p" de 0,00121 (Fig.5). En el análisis ANOVA, un P-value menor de 0,05 indica diferencias significativas entre los compuestos analizados, por tanto, se puede suponer que existe algún factor diferencial entre especies que hace que, sometidas al mismo proceso de lixiviación, las pérdidas de materia orgánica sean significativamente diferentes.

**Univariate Tests of Significance for %pérdida de peso
(Spreadsheet5) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition**

	SS	Deg r. of	MS	F	p
Intercept	439,0073	1	439,007	73,2724	0,000002
Especie	185,5396	3	61,8465	10,3225	0,00121
Error	71,8973	12	5,9914		

Figura 5. Análisis ANOVA de una vía de los datos de "pérdidas de peso" de las especies analizadas. En la tabla se representan: (SS) suma de cuadrados, (Deg r.OF) Grados de libertad del tratamiento, (MS) Promedio de los cuadrados, (F) Valor estadístico de contraste y (P) P-value.

Las tres especies de árboles a considerar podemos dividirlos en 2 grupos: la especie caducifolia (*Juglans regia*) y las especies perennifolias (*Quercus ilex*, *Pinus sylvestris*). En las especies caducifolias existe una pérdida de la hoja en cada ciclo anual, mientras que en las perennifolias la hoja se mantiene más tiempo y necesitan periodos de 4-5 años para renovarse. Para que las hojas de especies perennifolias puedan soportar las condiciones adversas que se dan, sobre todo, en los meses de invierno (soportando bajas temperaturas) y en los de verano (intentando minimizar la transpiración), presentan diferentes sustancias ceras que las protegen. Estas sustancias, que constituyen un sistema de adaptación a condiciones climatológicas adversas, están presentes en menor medida en hojas de especies caducifolias (Ricklefs, 2001). Las especies *Quercus ilex* y *Pinus sylvestris*, debido a su protección de naturaleza ceras, tienen una mayor resistencia a la lixiviación, ya que estos compuestos impermeables e hidrofóbicos impiden la solubilización de compuestos polares. De esta manera



Juglans regia, que presenta una menor cantidad de estos compuestos impermeables en la superficie de sus hojas, está más expuesto a los procesos de lixiviación y por tanto, pierde mayor porcentaje de materia orgánica. Dentro de las especies perennifolias, la diferente distribución de esos componentes cerosos, así como la propia morfología foliar, hacen que la lixiviación difiera entre ellas, a pesar de que los resultados que obtenemos son muy similares (Fig. 4).

Además, la elevada proporción de iones presentes en las hojas caducifolias, tales como hierro, manganeso, potasio y otros elementos, permiten explicar que se pierda mayor cantidad de material de la hoja debido a la lixiviación (Ostrowsky, 1997). No obstante diversos estudios señalan que la tasa de procesamiento de las hojas caídas en otoño depende en gran medida de la proporción de taninos en la hoja, viéndose favorecida por la concentración de nitrógeno y desfavorecida a medida que aumenta la concentración de lignina y fenoles (Pereira et al., 2007).

Agradecimientos

A la Dra. Leonor Calvo Galván, profesora de la asignatura Bases de Ecología de 5º curso de Licenciatura en Biotecnología, dentro de cuyo contexto se encuentran los experimentos descritos en el presente artículo, por la revisión del texto y sus ánimos para sacar adelante esta publicación.

A D. Fernando González Romero, Ingeniero de Montes y Licenciado en Ciencias Ambientales, que ha cedido las fotografías originales que componen la Figura 1.

A nuestros compañeros de la asignatura que realizaron algunos experimentos cuyos resultados hemos incluido en el texto.

Bibliografía

- Al-Riyami, V. R., Seena Sahadevan, Elshafie Abdulkadir, and Feliz Bärlocher. 2009- Leaf Decomposition in a Mountain Stream in the Sultanate of Oman. *International Review of Hydrobiology* 96, no. 1: 16-28.
- Álvarez-Sánchez, J. 2001. Descomposición y ciclo de nutrientes en ecosistemas terrestres en México. *Acta zoológica mexicana*, nº especial 1 : 11-27.
- Castro-Díez, P., P. Villar-Salvador, C. Pérez-Rontomé, M. Maestro-Martínez, and G. Montserrat- Martí. 1997. Leaf morphology and leaf chemical composition in three Quercus (Fagaceae) species along a rainfall gradient in NE Spain. *Trees -Structure and Function* 11, no. 3: 127-134.
- Dajoz, R. Tratado de ecología. Ed. MP, 2001.
- Drossopoulos, B., G.G. Kouchaji, and D.L. Bouranis 1996. Seasonal dynamics of mineral nutrients and carbohydrates by walnut tree leaves. *Journal of Plant Nutrition* 19: 493-516.



- Lopez Gorge, J. Fijación y movilización biológica de nutrientes (Vol. I). CSIC. 1991.
- Margalef, R. Ecología. Ed. Omega, 2004.
- McTiernana, K.B., M.M Coûteaux, B. Berg, M.P. Berg, R.C. de Anta, A. Gallardo, W. Kratz, P. Piussi, J. Remacle, A. V. De Santo. 2003. Changes in chemical composition of *Pinus sylvestris* needle litter during decomposition along a Europe coniferous forest climatic transect. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 801–812.
- Nykvist, N. 1963. Leaching and decomposition of water-soluble organic substances from different types of leaf and needle litter. *Estudia Forestalia Suecica* no.3 : 1-31.
- Ostrofsky, M. L. 1997. Relationship between Chemical Characteristics of Autumn-Shed Leaves and Aquatic Processing Rates. *Journal of the North American Benthological Society* 16, nº 4 : 750-759.
- Pereira, J.A., I. Oliveira, A. Sousa, P. Valentão, P.B. Andrade, I.C. Ferreira, F. Ferreres, A. Bento, R. Seabra, L. Estevinho. 2007. Walnut leaves: phenolic compound, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology* 45, no. 11: 2287–2295.
- Petersen, R. C. y K. W. Cummins. 1974. Leaf processing in a woodland stream. *Freshwater Biology* 4: 343–368.
- Ricklefs, R. E. Invitación a la ecología. La economía de la naturaleza. 4ª Edición. Ed. Panamericana., 2001.
- Romane, F. y J. Terradas. 1992. *Quercus ilex* L. ecosystems: function, dynamics and management. Kluwer Academic Publishers: 13-17.
- Sabaté, S., A. Sala y C. Gracia. 1995. Nutrient content in *Quercus ilex* canopies: Seasonal and spatial variation within a catchment. Kluwer Academic Publishers: 297-304.



BAÚL DE LA CIENCIA

Investigación básica sobre hepatocarcinoma en la Universidad de León

José L. Mauriz González, Sara Carbajo Pescador, Javier Martín Renedo

Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED) y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Universidad de León.

La investigación biomédica básica es fundamental para el conocimiento de la fisiopatología y el tratamiento de enfermedades, tanto humanas como animales. Desde el Instituto Universitario de Biomedicina de la Universidad de León se viene trabajando desde hace algún tiempo, intentando aunar los esfuerzos de los científicos básicos y de los clínicos, para que trabajen conjuntamente en diversas áreas de interés biomédico.

Nuestro grupo tiene carácter multidisciplinar (actualmente está formado por biólogos, biotecnólogos, médicos, farmacéuticos y veterinarios), y trabaja desde hace años en temas relacionados con la fisiología y la fisiopatología hepática y digestiva. Un área de interés para nuestro grupo es el estudio de nuevas estrategias quimioterapéuticas en el tratamiento del hepatocarcinoma humano, el principal tipo de tumor hepático y cuyo pronóstico no suele ser favorable en la mayoría de los casos. Nuestros estudios se basan tanto en modelos animales como en modelos celulares, así como en el uso de biopsias provenientes de pacientes. En el presente artículo de divulgación enfocamos el interés de la investigación en este tipo de tumor y mostramos, a modo de ejemplo, algunos de los resultados que hemos alcanzado recientemente, utilizando la hormona melatonina en un modelo in vitro de hepatocarcinoma. No obstante, muchas son las líneas abiertas en nuestro horizonte y nos planteamos en un futuro próximo testar otras moléculas con potencial interés en el tratamiento de tumores hepáticos, con el objeto de analizar y comprender sus efectos sobre diversas vías de señalización intracelular implicadas en el cáncer y la apoptosis.

Palabras clave:

Cáncer, hepatocarcinoma, investigación básica, investigación traslacional.

Investigación biomédica básica en enfermedades hepáticas y gastrointestinales en la ULE

A pesar de encontrarnos en una ciudad relativamente pequeña como es León, existe un gran número de investigadores en la Universidad de León (ULE) interesados por múltiples campos relacionados con las ciencias biomédicas, experimentales o la tecnología.

Muchas veces pensamos en el científico como persona aislada; nada más

lejos de la realidad, y más aún en pleno siglo XXI. Nuestro grupo de investigación está incluido en el Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED) de la Universidad de León <http://institutobiomedicina.unileon.es/> (Fig. 1). Dicho Instituto nació con el objeto de nuclear los esfuerzos que diferentes grupos llevaban realizando en diversas áreas de la investigación biomédica. Podéis encontrar más información sobre IBIOMED tanto en Wikipedia http://es.wikipedia.org/wiki/Instituto_de_Biomedicina, como en



Facebook <http://www.facebook.com/pages/Instituto-de-Biomedicina-IBIOMED/109035229165089> o en Twitter <http://twitter.com/IBIOMED1/statuses/131773120783728640>

Figura 1. Sede del IBIOMED de la Universidad de León.

En concreto, nuestro grupo se centra en la investigación en enfermedades hepáticas y gastrointestinales, estando formado en la actualidad por biólogos, biotecnólogos, médicos, farmacéuticos, veterinarios, etc. Dentro de dicho grupo existen actualmente diferentes líneas abiertas complementariamente: hepatitis, enfermedades intestinales, estrés oxidativo, enfermedades víricas y tumores hepáticos. Nuestro grupo forma parte del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas del Instituto de Salud Carlos III (CIBERehd) y está reconocido como grupo de Excelencia por la Junta de Castilla y León. Nuestra Universidad, además, forma parte del Cluster de Oncología de Castilla y León (Biotecyl), agrupación de científicos y empresas interesadas en la investigación y en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en diversos tipos de tumores. Igualmente, tenemos relaciones con grupos de diversos grupos internacionales repartidos por Francia, Italia, Suecia, Alemania o Estados Unidos, lo que nos permite trabajar desde León con la puerta abierta al mundo.

¿Cómo podemos contribuir los científicos básicos al tratamiento de enfermedades? La ciencia biomédica crece a base del esfuerzo realizado por investigadores básicos y clínicos. Cada jornada de trabajo en el laboratorio debe contribuir, en mayor o menor medida, a acrecentar de forma directa o indirecta el conocimiento sobre la fisiopatología y/o el tratamiento de la enfermedad. Debemos mantener una continua relación con los clínicos, esto nos permite a nosotros conocer cuáles son los principales retos actuales de la medicina y a

ellos acceder “de primera mano” a los conocimientos que el trabajo en el laboratorio nos va rindiendo. En los últimos años se ha acuñado el término investigación traslacional, que es aquella que busca llevar los conocimientos desde la meseta del laboratorio a la consulta del médico. Está claro que TODOS los que nos dedicamos a la investigación, ya sea básica, traslacional o clínica, tenemos como meta la mejoría en la prevención, el diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano (Fig. 2).



Figura 2. Interrelación entre ciencia básica, traslacional y clínica.

Muchos son los problemas que afectan en la actualidad a los científicos, no sólo en León sino también en toda Europa y en el mundo. Por un lado, la formación de nuevos científicos es un proceso muy largo y costoso; cualquier estudiante que quiera iniciarse en la investigación debe estar capacitado intelectual y físicamente para ser capaz de aprender durante años a investigar: tras la Licenciatura/Grado vendrá el Máster, a continuación el Doctorado y si todo va bien un periodo post-doctoral en el extranjero. Durante los años de Máster, Doctorado y Post-Doc son muchas las jornadas en el laboratorio y grandes los gastos económicos que ello supone para un grupo de investigación. La financiación de los grupos de investigación proviene de la concesión de proyectos de investigación por parte del gobierno (tanto autonómico como nacional y europeo) y de empresas o fundaciones. La financiación directa para el joven investigador corre a cargo de diversas becas financiadas también por entidades oficiales y/o privadas, mediante sistemas competitivos que dan acceso solo a un pequeño porcentaje de los mejores candidatos. Tanto en el caso de los grupos de investigación como en el de los jóvenes investigadores, la financiación se está viendo recortada de forma importante en los últimos años, y la situación parece que puede prolongarse aún bastante tiempo.

Hepatocarcinoma: el tumor hepático más frecuente

La población general está convencida de que el cáncer es una sola



enfermedad, cuando debemos considerarlo sin embargo como un conjunto de más de 120 enfermedades diferentes (algunos autores hablan de cerca de 200 enfermedades). Si bien la probabilidad de padecer cáncer se incrementa exponencialmente con la edad, este tipo de enfermedades puede afectar a individuos de cualquier edad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, o WHO en inglés) el cáncer será responsable de la muerte de 9 millones de personas en 2015 y de 11,4 millones en 2030. El cáncer constituye la segunda causa de muerte en Europa en el conjunto de la población, y es la primera entre los individuos de 45 a 60 años de edad. En el caso de España produce unos 92000 fallecimientos al año, siendo la primera causa de muerte en los individuos entre 40 y 79 años de edad, y la segunda en los mayores de 80 años (Centro Nacional de Epidemiología de España). Por todo ello, el estudio de la etiología, evaluación y/o tratamiento del cáncer supone un gran reto para un buen número de científicos tanto a nivel nacional como internacional.

En IBIOMED existe una línea de investigación en tumores hepáticos del cual forman parte los autores del presente artículo. En los últimos años se ha centrado en el conocimiento de las bases moleculares del hepatocarcinoma, el tumor hepático más frecuente, y en la búsqueda de nuevas dianas y estrategias quimioterapéuticas.

El hígado es el órgano interno más grande del organismo humano, llegando a pesar en un hombre adulto entre 1,3 y 1,5 kg, localizado inmediatamente por debajo del diafragma en la cavidad abdominal. Es un órgano lobulado, rodeado de una fina capa de tejido conectivo denominado Cápsula de Glisson compuesta de fibras colágenas. Aproximadamente el 70% de la población celular total del hígado está constituida por los hepatocitos que forman el parénquima hepático, siendo el otro 30% constituido por las denominadas células sinusoidales (de los capilares hepáticos) entre las que cabe destacar células endoteliales de los capilares hepáticos, las células de Kupffer (macrófagos, representan hasta un 20%), las células de Ito (lipocitos con capacidad para almacenar lípidos y vitaminas liposolubles) y células de Pit (de aspecto granular, son las natural killer hepáticas). El hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (HCC) es el tumor que aparece por la proliferación de hepatocitos malignos.

El HCC es, por incidencia, la quinta neoplasia más frecuente en el mundo, y la tercera causa más común de fallecimiento relacionado con el cáncer, produciéndose la muerte de entre 600.000 y 1.000.000 de personas cada año en el mundo. La incidencia mundial del hepatocarcinoma celular es de 5,5-14,9 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, diagnosticándose cada año más de 500.000 nuevos casos, siendo su aparición más frecuente en hombres que en mujeres, con una tasa de incidencia de aproximadamente 3:1 (Kew, 2002;



Ferlay et al., 2010). Los datos para España sitúan a esta enfermedad en el quinto lugar por número de muertes relacionadas con el cáncer, existiendo una proporción entre hombres y mujeres, parecida a la mundial, de 2,6:1 (López-Abente et al., 2005).

Los agentes causales más comunes del HCC son el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C y la aflatoxina B1, siendo juntos, responsables de aproximadamente el 80% de los casos de HCC. La causa más común de HCC en países desarrollados es la cirrosis ligada a la infección por virus de la hepatitis C (HCV), mientras que en países en vías de desarrollo está relacionado con la infección crónica con el virus de la hepatitis B (HBV) (Bruix et al., 1989; Bosch et al., 1999; Tan, 2011). Además de estas causas se pueden citar otras, como el alcohol o la hemocromatosis, capaces de producir cirrosis, llegando a desencadenar cáncer hepático.

El contexto en el que la neoplasia aparece es en una hepatitis crónica o una cirrosis, situación en la que son destruidos muchos hepatocitos sanos, existiendo una invasión del hígado por células inflamatorias, depositándose tejido conectivo, lo que puede producir alteración de la matriz extracelular y del microambiente hepático. El proceso desencadenante del HCC transcurre durante un periodo largo (aproximadamente de 10-25 años) y como ya hemos indicado puede ser inducido por la infección crónica por HBV o HCV. Parte de los pacientes infectados por dichos virus pueden desarrollar una cirrosis que puede desencadenar el HCC, partiendo éste particularmente desde hepatocitos displásicos (Bruix et al., 1989; Bosch et al., 1999; Tan, 2011).

Los fármacos utilizados en el tratamiento del HCC son citotóxicos y no específicos para el tratamiento de esta enfermedad, presentando un gran número de efectos secundarios. Desafortunadamente, no más del 30% de los pacientes son candidatos para las estrategias terapéuticas actuales, y la mayoría de ellos se enfrentan a un mal pronóstico. A pesar de los esfuerzos en investigación realizados en esta materia, todavía existen controversias en cuanto las aproximaciones terapéuticas más adecuadas para el tratamiento del HCC. Por todo ello, dicha área de investigación tiene un gran interés, que radica tanto en el conocimiento de las vías de señalización implicadas en el desarrollo del HCC, como la utilización de diversas sustancias (tanto endógenas como sintéticas) en el potencial tratamiento de la enfermedad.

Modelos de estudio del hepatocarcinoma en el laboratorio

En la actualidad, los científicos básicos interesados en el HCC humano contamos con varias vías de estudio de la enfermedad: obtención de muestras de pacientes, estudios in vitro con hepatocitos tumorales humanos y estudio in vivo en modelos animales.

La primera vía consiste en el trabajo con muestras provenientes de pacientes afectados de la enfermedad, existiendo dos alternativas: biopsias recogidas mediante punción/aspiración en el enfermo (técnica invasiva utilizada conjuntamente con técnicas de imagen) y muestras provenientes de hepatectomía (extirpación) parcial o total de pacientes que van a ser posteriormente sometidos a trasplante hepático. A pesar de lo que podría parecer en un primer momento, estas dos alternativas no resultan las más interesantes; en el caso de la biopsia la cantidad de tejido es muy pequeña, mientras que el caso de muestras derivadas de hepatectomías supone estar en contacto con servicios de cirugía que realicen esta técnica quirúrgica frecuentemente (algo difícil en León puesto que el hospital de elección para esta cirugía en nuestra comunidad se encuentra en Salamanca). Además, en ambos casos existe gran dificultad técnica para el estudio de vías moleculares clave en la progresión pero sobretodo en el tratamiento del HCC, puesto que las condiciones en las que obtenemos las muestras nos limitan mucho.

Otra posibilidad es el uso de estudios in vitro con tumorales humanos. Se trata de líneas celulares previamente establecidas y que podemos cultivar en el laboratorio pudiendo controlar gran número de aspectos (cantidad de oxígeno, nutrientes, factores de crecimiento, etc.) (Fig. 3). En nuestro caso existen tres líneas celulares que nos interesan mucho, se trata de HepG2 (p53 wt), HuH7 (p53 mutado) y Hep3B (p53 nulas) (Fig. 3); aunque existen otras múltiples líneas como SK-Hep1, SNU-398 etc. Estas células pueden adquirirse en diferentes bancos celulares como ATCC (American Type Culture Collection), ECACC (European Collection of Cell Cultures), ECCO (European Culture Collections' Organisation), JSCC (Japan Society for Culture Collections), o a partir de otros investigadores. El uso de modelos in vitro tiene diversas ventajas pues permite la profundización en mecanismos moleculares: se trata de células de un solo origen (con lo que se favorece la homogeneidad y reproducibilidad) y

la represión de la expresión génica es más sencilla.

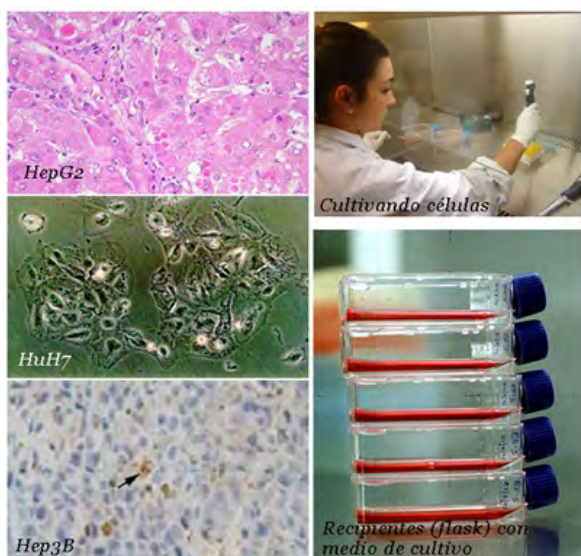


Figura 3. Cultivo de células hepáticas. Algunas de las líneas celulares mencionadas en el texto.

La tercera vía de estudio consiste en la inducción del HCC en modelos animales. Lógicamente para ello debemos contar con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad y con la acreditación para trabajar con animales de experimentación que expide la Junta de Castilla y León. Como investigadores interesados en las Ciencias de la Vida, el uso de animales de experimentación debe estar restringido al mínimo, tratando de provocar el menor sufrimiento posible a los animales. Los animales son una buena alternativa para reproducir enfermedades, conocer su evolución y abordar nuevas terapias. Los animales utilizados deben tener la mayor homogeneidad posible desde diversos puntos de vista: somática (sexo, peso, edad, etc.), genética (igualdad o similitud biológica) y sanitaria (deben ser axénicos -sin gérmenes-, gnotoxénicos -controlados- y sanos). En la Universidad de León tenemos la suerte de contar con un moderno y cuidado Servicio de Animalario, que se encarga de la compra, control y mantenimiento de los animales solicitados por los investigadores. La principal ventaja del uso de animales es que nos permite conocer los mecanismos en un organismo completo, estudiar las interacciones y los efectos secundarios; además podemos trabajar con modelos knockout modificados genéticamente. En el estudio del HCC solemos utilizar ratas y ratones a los que se les induce la enfermedad, bien mediante la administración de sustancias químicas (Fig. 4), o bien mediante trasplante ortotópico de células tumorales o su inyección directa en el propio hígado o en el torrente sanguíneo hepático (Fig. 5) (Khare et al., 2011). En ambos casos contamos con dificultades: el método químico es muy largo y para el desarrollo del HCC hacen falta unas 16 semanas de evolución. En el caso de trasplante o inyección de células contamos con la dificultad que supone que el sistema inmune de estos animales es muy eficiente eliminando las células tumorales, por lo que en muchas ocasiones es necesario utilizar animales atímicos con el sistema inmune debilitado.

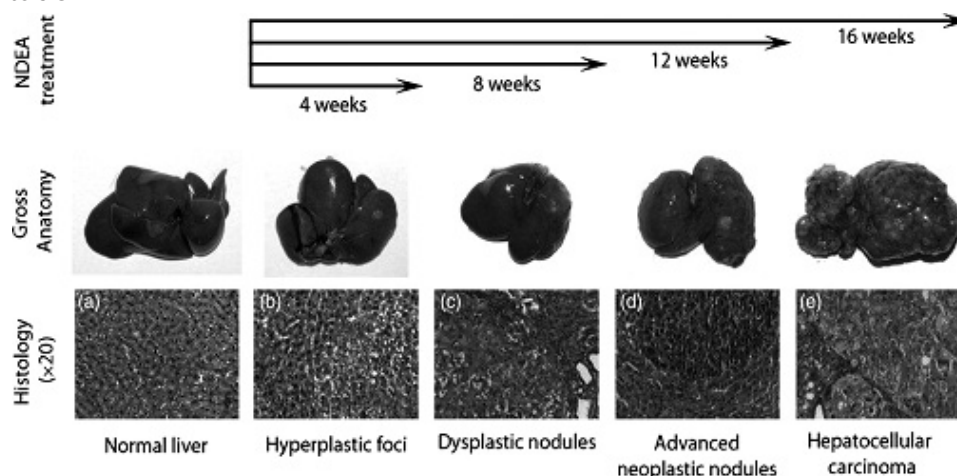


Figura 4. Desarrollo del HCC tras administración de sustancias químicas en modelos animales.

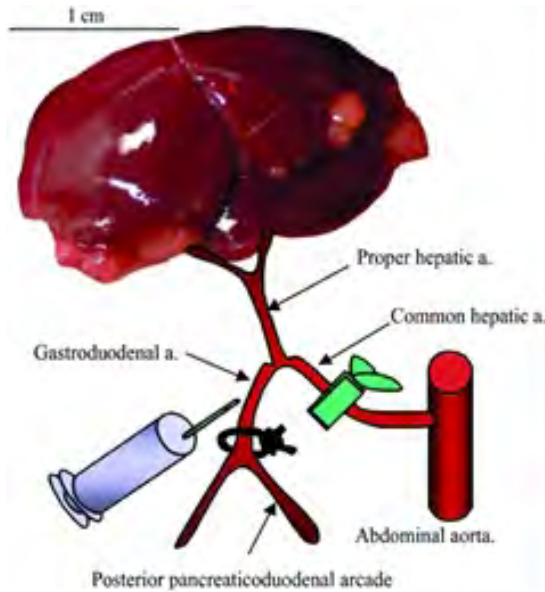


Figura 5. Inyección de células tumores para inducción de HCC.

Características básicas de los tumores: la búsqueda de nuevas dianas quimioterapéuticas

Como ocurre en el resto de tipos de cáncer, el HCC tiene una serie de características interesantes (Fig. 6) y cuyo estudio puede tener interés en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas (puntos diferenciadores o débiles donde podemos atacar al tumor) (Hanahan y Weinberg, 2011).

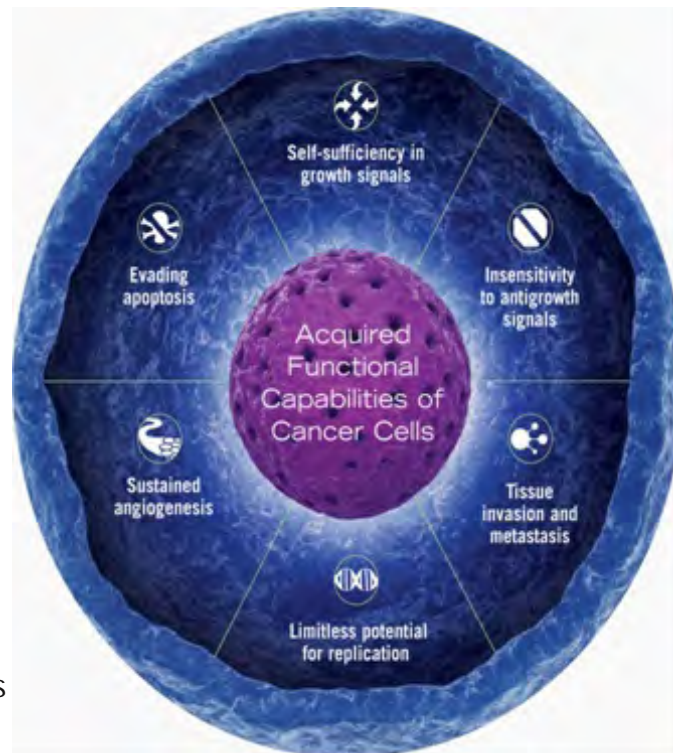


Figura 6. Características de las células tumorales

En primer lugar, los hepatocitos tumorales tienen capacidad para producir señales proliferativas. Además, son relativamente insensibles a las



señales anti-proliferativas. Esto hace que puedan dividirse aparentemente sin límites incrementando su número, lo que da lugar a la aparición de tumores. Estas características están muy relacionadas con la desregulación del ciclo celular.

También, los hepatocitos tumorales son capaces de evadir la muerte celular programada por apoptosis; de forma que se vuelven prácticamente inmortales.

Finalmente, son capaces de producir sustancias pro-angiogénicas (fundamentalmente VEGF –factor de crecimiento del endotelio vascular- o HGF, factor de crecimiento de hepatocitos-). La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes, lo que va a favorecer una mejor perfusión sanguínea (mayor llegada de O₂ y nutrientes a las propias células tumorales) y una vía de escape (los hepatocitos tumorales tienen facilidad para separarse de otros, entrar a los vasos sanguíneos y migrar hacia otros tejidos, produciendo las denominadas metástasis).

La melatonina como sustancia antitumoral en el HCC

A lo largo de los últimos 10 años nuestro grupo ha venido trabajando en diferentes modelos de HCC: hemos testado el efecto de alguna sustancia antiangiogénica como el TNP-470 en modelos animales (Mauriz et al., 2003, 2007a, 2007b) o en estudios más moleculares analizando la cooperación entre diversos factores de transcripción (proteínas que entran al núcleo y favorecen la expresión de genes proliferativos) (Toualbi et al., 2007, 2008). Paralelamente, y durante los últimos años, hemos analizado in vitro la capacidad anti-proliferativa y pro-apoptótica de la melatonina en hepatocitos tumorales cuando es administrada a dosis farmacológicas (muy por encima de los niveles fisiológicos normales) (Martín-Renedo et al., 2008; Carbajo-Pescador et al., 2009, 2011). La melatonina es una sustancia que se ha encontrado en una gran variedad de seres vivos, desde bacterias y protozoos, hasta plantas, hongos e invertebrados (Tan et al., 2010). En cuanto a los vertebrados y en concreto a los mamíferos, la melatonina es una hormona sintetizada principalmente por la glándula pineal, aunque existen otras fuentes secundarias de melatonina como son la retina y la médula ósea. La melatonina, fisiológicamente, se ha relacionado con la regulación de los ritmos biológicos y como antioxidante natural. Se ha demostrado que la melatonina tiene actividad oncostática tanto in vivo como in vitro en principalmente en cáncer de mama (Grant et al., 2009). Los datos sobre el efecto de la melatonina en el HCC no habían sido todavía testados, por lo que nos propusimos analizar su efecto sobre los hepatocitos tumorales. Nuestra curiosidad se acrecentó todavía más cuando estudios previos que nosotros mismos habíamos realizado, comparando ratas ancianas y

ratas jóvenes (en ambos casos sanas), nos habían demostrado los beneficios sobre la fisiología hepática de la melatonina (Molpeceres et al., 2007; Mauriz et al., 2007c).

Para analizar los efectos de la melatonina en el HCC hemos venimos trabajando con la línea de hepatocitos tumorales denominada HepG2, que ha rendido interesantes resultados (Martín-Renedo et al., 2008; Carbajo-Pescador et al., 2009, 2011). Básicamente, cultivamos dichos hepatocitos tumorales hasta llegar a una fase de proliferación, momento en el que administramos la melatonina disuelta en medio de cultivo (como en otros casos, los medios de cultivo son reemplazados cada 48 horas). Inicialmente hicimos un screening utilizando diversas concentraciones farmacológicas de melatonina y administradas a distintos tiempos para determinar si la hormona era capaz o no de producir la muerte de los hepatocitos tumorales; para ello utilizamos dos ensayos muy simples como son la captación de MTT (un sustrato que es transformado dando color azul solo en las células vivas) y la liberación de LDH al medio de cultivo (la LDH o lactato deshidrogenasa es una enzima citosólica liberada al medio de cultivo cuando las células mueren) (Fig. 7) (Martín-Renedo et al., 2008). Gracias a estos dos sencillos ensayos pudimos determinar cuál era la concentración mínima de melatonina que era capaz de producir la muerte de los hepatocitos tumorales.

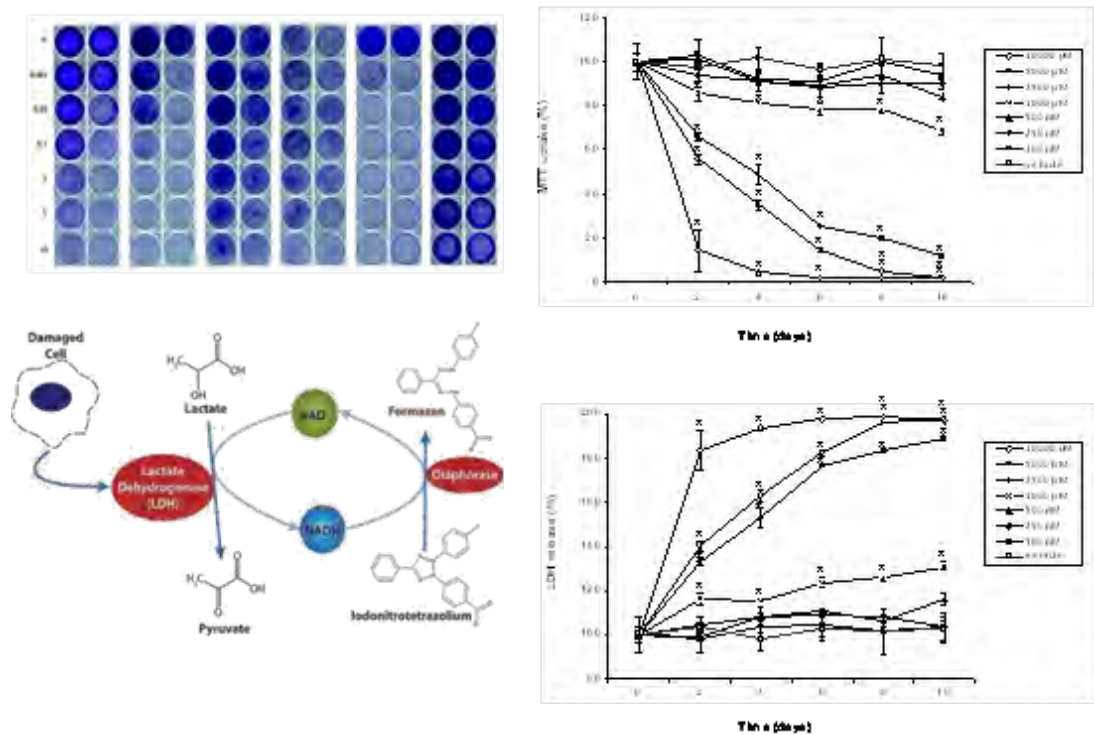


Figura 7. Captación de MTT y liberación de LDH en HepG2 tratadas a diversas dosis de melatonina.

Una de las finalidades del tratamiento antitumoral consiste en la parada del ciclo celular, que como hemos indicado anteriormente está desregulado durante el HCC, favoreciendo su progresión (Fig. 8).

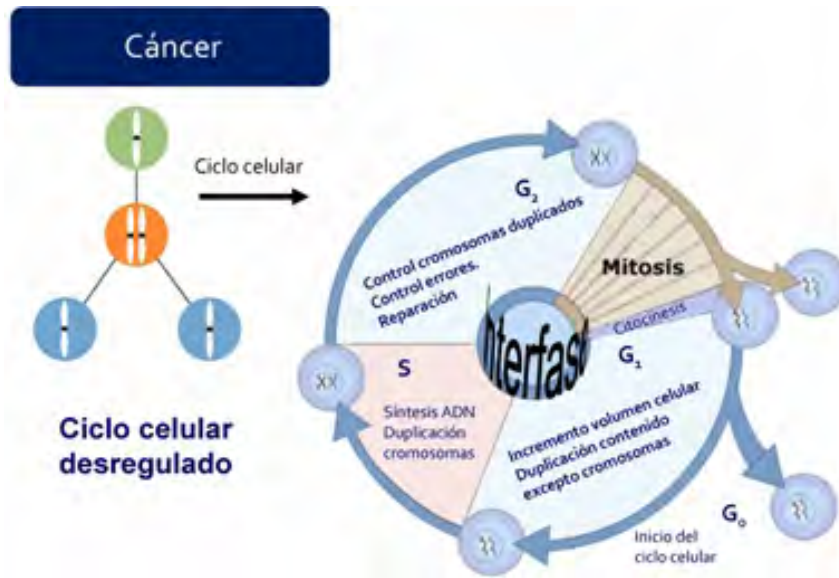


Figura 8. El ciclo celular está desregulado en los procesos tumorales.

Lógicamente, uno de los objetivos de la terapia antitumoral es frenar el ciclo celular en las células tumorales. En nuestros experimentos, pudimos comprobar que la hormona tenía capacidad citostática, era capaz de parar el ciclo celular de los hepatocitos tumorales en la transición de las fases G₂/M cuando el ciclo era analizado mediante citometría de flujo (Fig. 9) (Martín-Renedo et al., 2008).

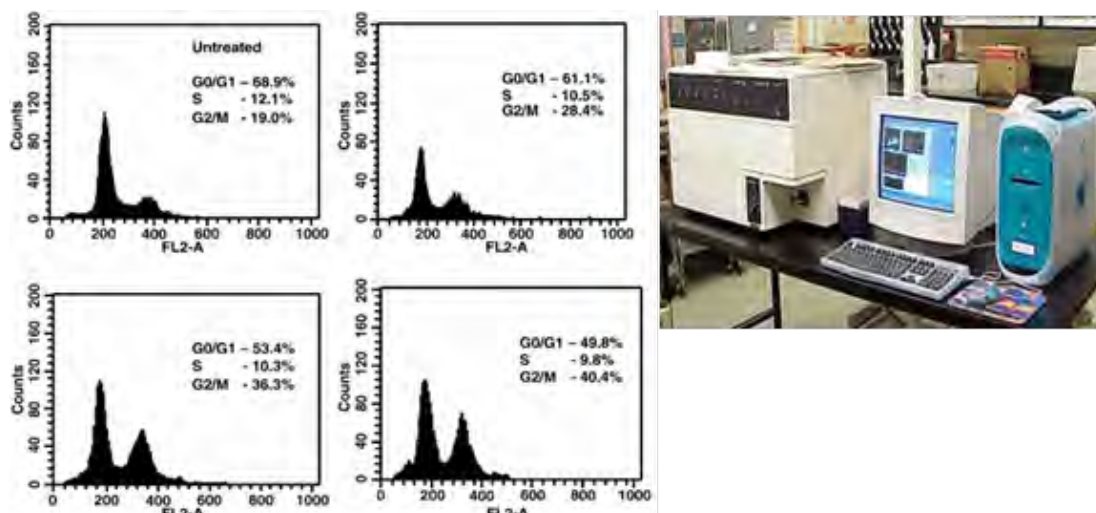


Figura 9. Efecto citostático de 3 concentraciones diferentes de melatonina en células HepG2 y equipo de citometría de flujo.

Este efecto citostático de la melatonina administrada a dosis

farmacológicas parece dependiente de p21, una proteína inhibidora de quinasas dependientes de ciclina, capaz de parar el ciclo celular cuando es sobre-expresada por un mecanismo dependiente del gen supresor de tumores p53 (Fig. 10) (Martín-Renedo et al., 2008).

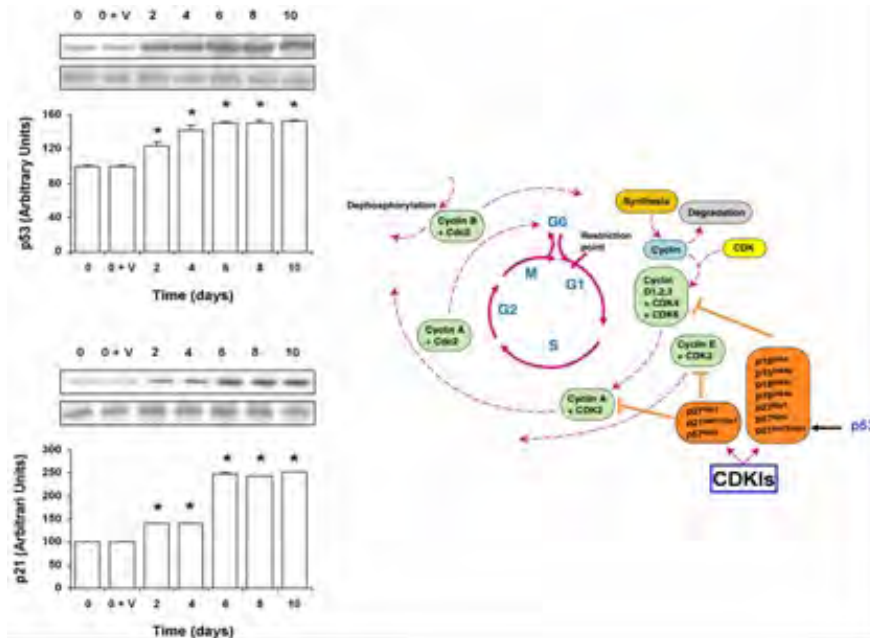


Figura 10. Efecto de la melatonina sobre p21-p53.

Como hemos referido anteriormente otra de las características de muchas células tumorales es su capacidad para evadir la fuerte celular por apoptosis. El organismo humano y de los animales está diseñado de forma que cuando existe un daño importante y significativo es induzca el programa de muerte celular por apoptosis, de esa forma se evita la división de las células dañadas y por ello aparición de nuevas células defectuosas (Fig. 11).

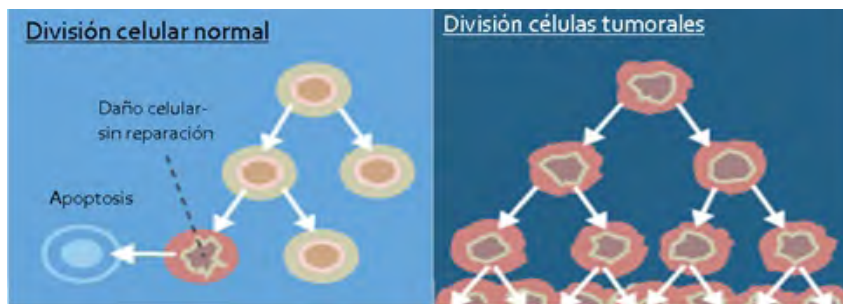
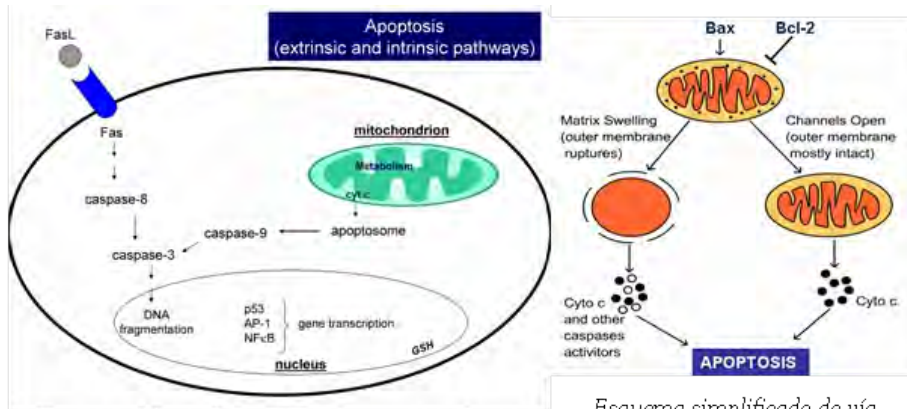


Figura 11. La apoptosis puede estar inhibida en la mayoría de las células tumorales.

Existen diversas vías relacionadas con la apoptosis (Fig. 12). En nuestro trabajo nos interesamos por la denominada vía intrínseca (dependiente de la mitocondria) y con la vía extrínseca (relacionada con receptores de muerte como FAS). Hemos podido comprobar que la melatonina es capaz de inducir

apoptosis en células HepG2, observando incremento en la actividad de la caspasa-3 (enzima que produce la proteólisis de diferentes componentes celulares durante la apoptosis), en las caspasas -8 y -9, y en la lisis de la proteína PARP (relacionada con la reparación del DNA, y que sufre degradación cuando existe apoptosis). La apoptosis parecía más relacionada con la inducción de la vía intrínseca (mitocondrial), observándose que la melatonina era capaz de inducir la liberación de citocromo C desde la mitocondria, con inducción de la proteína proapoptótica Bax y represión de la anti-apoptótica Bcl-2 (Martín-Renedo et al., 2008).



Esquema básico de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis

Esquema simplificado de vía intrínseca de la apoptosis

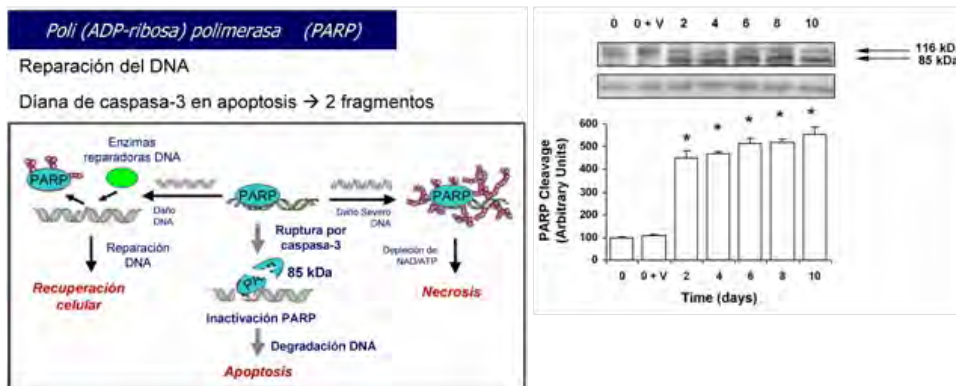


Figura 12. PARP se degrada dando lugar a 2 fragmentos cuando se induce apoptosis al tratar a los hepatocitos tumorales con melatonina

Hemos identificado diversas vías de señalización intracelular relacionadas con los efectos de la melatonina, comprobando que su administración a dosis farmacológicas es capaz de inducir principalmente a JNK1,2,3 y a p38 (Fig. 13).

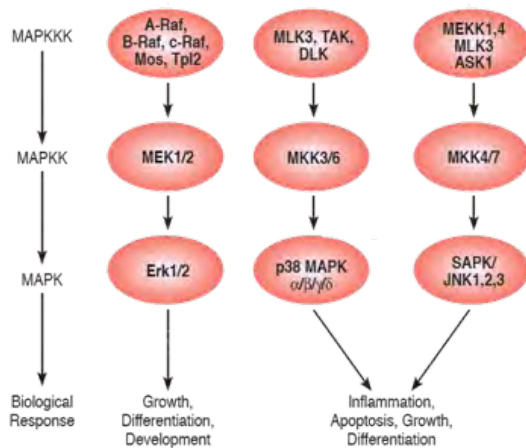


Figura 13. Via MAPK en diversas situaciones fisiopatológicas.

Hemos profundizado también en el análisis de cual es el receptor celular más implicado. Se ha descrito que existen varios receptores celulares de la melatonina, tanto a nivel de membrana como citosólico o nuclear. Los efectos antitumorales de la melatonina parecen relacionados principalmente con el receptor de membrana MT1, puesto que cuando lo inhibimos químicamente desaparecen dichos efectos (Fig. 14) (Carbajo-Pescador et al., 2009, 2011).

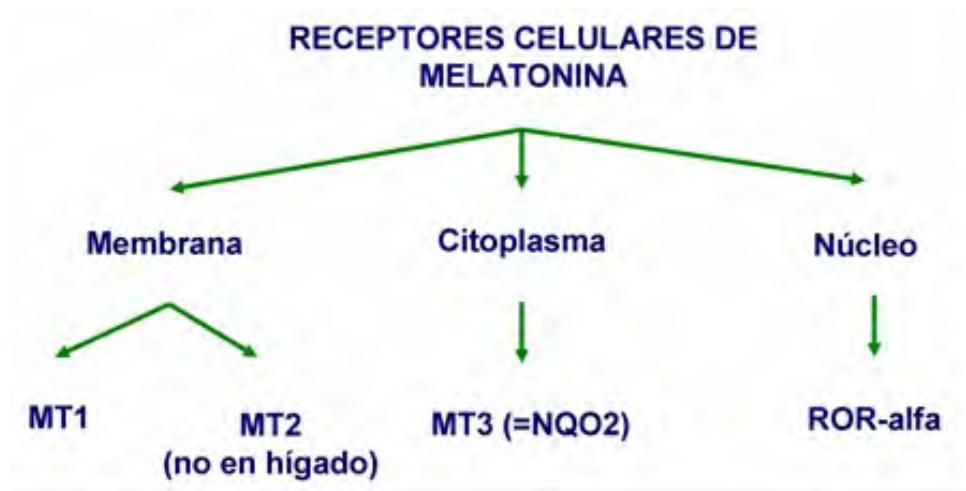


Figura 14. Receptores celulares de la melatonina.

Curiosamente, los efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos que la melatonina exhibe sobre los hepatocitos tumorales no se dan cuando la hemos administrado a hepatocitos sanos provenientes de biopsias de pacientes. Lo que parece indicar que esta sustancia, administrada en altas concentraciones, sería solo tóxica para los hepatocitos malignos y no tendría efectos negativos significativos sobre los sanos (Carbajo-Pescador et al., 2009, 2011).

Más recientemente, hemos obtenido prometedores resultados que nos indican que parte del efecto pro-apoptótico de la melatonina podría estar



relacionado con su capacidad para inducir la expresión de la proteína proapoptótica Bim mediante un mecanismo dependiente del factor de transcripción FoxO3A (que hemos sido capaces de bloquear cuando silenciábamos mediante siRNA a dicho factor de transcripción). Estos últimos experimentos, junto con otros relacionados con la angiogénesis en el HCC, todavía no han sido totalmente concluidos ni publicados, por lo que no parece conveniente por el momento su divulgación en detalle.

La importancia de la colaboración de un buen equipo

Como hemos indicado al principio de este pequeño artículo de divulgación, para que la ciencia avance es muy importante la formación de nuevos investigadores y la colaboración de diferentes profesionales. Aunque suene tópico, la investigación consiste en un trabajo muy intenso, que muchas veces no entiende de domingos y festivos, que debe realizarse en grupo y de forma muy comprometida. Nosotros tenemos la suerte de formar un grupo multidisciplinar que trabaja de forma integrada; así los resultados obtenidos por nuestro grupo en esta área de estudio son fruto del trabajo en IBIOMED de varios investigadores básicos (como Sara Carbajo Pescador, Javier Martín Renedo, Maiara Piva, Raquel Ordoñez, Javier González-Gallego o José Luis Mauriz), clínicos (como Andrés García Palomo, Pedro Linares, Francisco Jorquera, José Luis Olcoz o Jesús Culebras) y la colaboración de investigadores de otros centros de prestigio tanto nacionales como internacionales.

Bibliografía

- Bosch, F.X., Ribes, J. y Borrás, J. 1999. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis.* 19:271-285.
- Bruix, J., Calvet, X., Costa, J., Ventura, M., Bruguera, M., Castill, R., Barrera, J.M., Ercilla, G., Sánchez-Tapias, J.M., Vall, M., Bru, C. y Rodés, J. 1989. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet.* 3:1004-1006.
- Carbajo-Pescador, S., García-Palomo, A., Martín-Renedo, J., Piva, M., González-Gallego, J. y Mauriz, J.L. 2011. Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor. *J Pineal Res.* 51:463-467.
- Carbajo-Pescador, S., Martín-Renedo, J., García-Palomo, A., Tuñón, M.J., Mauriz, J.L. y González-Gallego J. 2009. Changes in the expression of melatonin receptors induced by melatonin treatment in hepatocarcinoma HepG2 cells. *J Pineal Res.* 47:330-338.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. y Parkin, D.M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int*



- J Cancer. 127:2893-917.
- Grant, S.G., Melan, M.A., Latimer, J.J., Witt-Enderby, P.A. 2009. Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. *Expert Rev Mol Med*. 11:e5.
- Hanahan, D. y Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646-674.
- Khare, S.P., Sharma, A., Deodhar, K.K., y Gupta, S. 2011. Overexpression of histone variant H2A.1 and cellular transformation are related in N-nitrosodiethylamine-induced sequential hepatocarcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 236:30-5.
- Kew, MC. 2002. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Toxicology*. 181-182:35-38.
- López-Abente Ortega, G., Pollán Santamaría, M., Aragonés Sanz, N. y Pérez Gómez, B. 2005. La Situación del Cáncer en España. Centro de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
- Martín-Renedo, J., Mauriz, J.L., Jorquera, F., Ruiz-Andrés, O., González, P. y González-Gallego, J. 2008. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res*. 45:532-540.
- Mauriz, J.L., Durán, M.C., Molpeceres, V., Barrio, J.P., Martín-Renedo, J., Culebras, J.M., González-Gallego, J. y González P. 2007a. Changes in the antioxidant system by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma. *Transl Res*. 150:189-196.
- Mauriz, J.L., Gonzalez, P., Duran, M.C., Molpeceres, V., Culebras, J.M. y Gonzalez-Gallego, J. 2007b. Cell-cycle inhibition by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma is mediated by a p53 and p21WAF1/CIP1 mechanism. *Transl Res*. 149:46-53.
- Mauriz, J.L., Linares, P., Macías, R.I., Jorquera, F., Honrado, E., Olcoz, J.L., González, P. y González-Gallego, J. 2003. TNP-470 inhibits oxidative stress, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Free Radic Res*. 37:841-848.
- Mauriz, J.L., Molpeceres, V., García-Mediavilla, M.V., González, P., Barrio, J.P. y González-Gallego, J. 2007c. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res*. 42:222-230.
- Molpeceres, V., Mauriz, J.L., García-Mediavilla, M.V., González, P., Barrio, J.P. y González-Gallego, J. 2007. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 62:687-695.
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Korkmaz, A., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Fuentes-Broto, L. y Reiter, R.J. 2010. The changing

biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 85:607-623.

Tan, Y.J. 2011. Hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 17:4853-4857.

Toualbi, K., Güller, M.C., Mauriz, J.L., Labalette, C., Buendia, M.A., Mauviel, A. y Bernuau, D. 2007. Physical and functional cooperation between AP-1 and beta-catenin for the regulation of TCF-dependent genes. *Oncogene.* 26:3492-3502.

Toualbi-Abed, K., Daniel, F., Güller, M.C., Legrand, A., Mauriz, J.L., Mauviel, A., Bernuau, D. 2008. Jun D cooperates with p65 to activate the proximal kappaB site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. *Carcinogenesis.* 29:536-543.



José Luis Mauriz Gutiérrez es profesor titular de Universidad en el Departamento de Ciencias Biomédicas. Docente en los Grados de Biología, Biotecnología y Veterinaria y en diversos Másteres oficiales. Es coordinador del Máster Universitario de Investigación en Medicina y Coordinador suplente del Programa de Doctorado de Biomedicina de la Universidad de León. Investigador del Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED) de la Universidad de León y del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) del Instituto de Salud Carlos III. Doctor en Biología por la Universidad de León (1999). Ha sido investigador del Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) en el Hospital Bichat de París, realizando además estancias en otros laboratorios nacionales e internacionales. Su investigación se centra en la fisiopatología de tumores hepáticos y digestivos, con especial énfasis en el estudio del hepatocarcinoma tanto en modelos in vivo como in vitro. Ha publicado más de una treintena de artículos en revistas biomédicas de prestigio internacional, dirigiendo y participando en diversos Proyectos de Investigación financiados por entidades tanto públicas como privadas, y colaborando con diversos grupos de investigación nacionales e internacionales. Sus actuales trabajos sobre los efectos antitumorales de la melatonina están siendo financiados por la Junta de Castilla y León (Ref LE117A11-2).



Sara Carbajo Pescador, licenciada en Biología, doctoranda en el Programa de Biomedicina de la Universidad de León, realiza su trabajo en IBIOMED como Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y Fondo Social Europeo). Sus investigaciones, dirigidas por los Dres. Mauriz y González-Gallego, se centran en el estudio de la melatonina en modelos in vitro de hepatocarcinoma, habiendo publicado artículos en revistas internacionales de prestigio y participando en diversos Proyectos de Investigación. Colabora estrechamente con el Departamento de Medicina Interna de la Universidad Johannes Gutenberg de Mainz (Alemania) y con el Departamento de Química de la Universidad Federal de Santa María (Brasil).



Javier Martín Renedo, Doctor en Biología, con Mención Europea, por la Universidad de León (2011), es actualmente Investigador Post-Doc en el Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia), financiado por la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Su tesis doctoral se centró en el estudio de moléculas anti-angiogénicas en modelos in vitro de hepatocarcinoma, realizándose en el IBIOMED bajo la dirección de los Dres. Mauriz y González-Gallego. Durante su tesis doctoral recibió financiación del Programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación. Ha publicado artículos en revistas de prestigio en su área de investigación y participado en diversos Proyectos de Investigación con financiación competitiva.

UNO DE LOS NUESTROS

Lynn Margulis (1938-2011): la bióloga con visión revolucionaria

Antonio Encina García

Área de Fisiología Vegetal. Universidad de León. Campus de Vegazana s/n. 24071. León. E-mail: a.encina@unileon.es

En noviembre del año pasado (2011) moría repentinamente a causa de un derrame cerebral Lynn Margulis, una de las biólogas más influyentes de la historia de esta ciencia; tenía 73 años. La recordaremos siempre por su excelente labor como divulgadora científica a través de sus numerosos, rigurosos y excelentes libros. Pero sin ninguna duda pasará a la historia de la ciencia como la coautora y defensora de una de las teorías más provocativas, estimulantes e innovadoras en el campo de la biología, la teoría de la endosimbiosis seriada para el origen de las células eucariotas.

Sus inicios

Lynn Margulis (Fig. 1), Lynn Petra Alexander por su nombre de soltera, nació en Chicago (Illinois, EUA) el 5 de Marzo de 1938. Era la primogénita de cuatro hermanas y se crió en el seno de una familia acomodada. Sus padres, Leona y Morris Alexander, eran una pareja popular en la sociedad de Chicago de la época y ambos tenían problemas con el alcohol. Ella misma dice sobre sus padres que "...hicieron todo lo que yo detesto". Sobre su etapa infantil y juvenil confiesa haber sido una estudiante rebelde, mandona, un tanto maleducada e hiperactiva (Properzio, 2004).



Figura 1. Lynn Margulis (1938-2011). Catedrática Honoraria de Geociencias de la Universidad de Massachusetts.

A los 16 años ingresa en la "University of Chicago Laboratory School" un centro de estudios universitarios asociado a la Universidad de Chicago. La Lynn Margulis adolescente nunca tuvo una clara vocación científica, de hecho comenzó los estudios superiores con el anhelo de ser escritora, pero su flechazo con la ciencia no tardó en llegar. A través de un curso de matemáticas aplicadas a la biología correspondiente a su segundo año de estudios, conoció los trabajos originales de Mendel. Quedó fascinada por las leyes de la herencia, lo que le

llevó a leer todo cuanto pudo sobre genética. Su futura carrera científica estaba encaminada (Lake, 2011).

En el año 1957, Lynn Alexander obtiene su graduado en ciencias, lo que los anglosajones denominan "Bachelor's Degree". Ese mismo año contrae matrimonio con el célebre astrofísico y divulgador científico Carl Sagan (Fig. 2). Tenían 19 y 22 años respectivamente y se habían conocido tres años antes en las aulas. De este matrimonio nacen dos hijos, Dorion (1959) y Jeremy Sagan (1960).



Figura 2. Imagen del matrimonio Sagan en el día de su boda. A la izquierda aparece la madre de Lynn Sagan, Leona Alexander. Tomado de <http://mothering.com/jennifermargulis/naming-the-baby/the-name-game-post-2>.

Años de formación

Lynn Alexander, en este momento Lynn Sagan, prosigue su formación y se traslada junto con su marido a la Universidad de Madison (Wisconsin, EUA) donde obtendría en 1960 el título de postgrado (Master Degree) en Zoología y Genética. La estancia en la Universidad de Madison representa un hito fundamental en su carrera científica.

Enrolada en el grupo de investigación del Dr. Walter Plaut comienza a trabajar con protistas, en concreto con amebas gigantes (*Amoeba proteus*). Mediante el uso de timidina radiomarcada pretenden obtener información sobre la síntesis y localización del ADN en estos organismos. Su primera publicación científica aparece en 1958 (Plaut y Sagan L, 1958) y en ella demuestran la presencia de elevadas cantidades de ADN citoplasmático. Este resultado es interpretado como efecto de la presencia de un agente infeccioso o por algún desconocido mecanismo de síntesis de ADN en el citoplasma. Están todavía lejos que entender que lo que realmente han descubierto es la presencia de ADN mitocondrial.

Con el paso del tiempo se acumulan los datos que apuntan a que mitocondrias y cloroplastos son diferentes a otros orgánulos citoplasmáticos, ya que pueden propagarse, confieren determinados caracteres hereditarios,



sintetizan proteínas y contienen ácidos nucleicos. Lynn Sagan se interesa por la aparente naturaleza independiente de las mitocondrias y cloroplastos y entra en contacto con los trabajos de Merechkowsky (1910) y Wallin (1927), que constituyen las primeras aproximaciones científicas a la teoría de la endosimbiosis como mecanismo de evolución.

Carl Sagan recibe en 1961 una propuesta de postdoctorado en la Universidad de Berkeley y toda la familia se traslada a Oakland (California, EUA). Lynn comienza en esta misma Universidad su tesis doctoral bajo la tutela del protistólogo marino Dr. Max Alfert. El cuidado de los niños hace imposible llevar a cabo la propuesta inicial de trabajo en un laboratorio oceánico (hubiera supuesto largas estancias fuera de casa) y se decanta por continuar con sus experimentos autorradiográficos, pero esta vez con protistas cloroplásticos, las euglenas (Properzio, 2004).

En 1963 la familia Sagan vuelve a trasladarse a la costa este de los EUA ya que Carl Sagan acepta un trabajo en el Departamento de Astronomía de la Universidad de Harvard (Boston, Massachusetts). Aunque Lynn tenía prácticamente terminada su tesis doctoral, abandona California sin haberla defendido. Se incorpora a la Universidad de Brandeis en Waltham, a pocos kilómetros de Boston, y compagina los experimentos necesarios para concluir su proyecto de tesis con la docencia (Properzio, 2004; Lake, 2011). En 1965 recibe el doctorado por la Universidad de Berkely con el trabajo titulado "Unusual pattern of thymidine incorporation in the cytoplasm of Euglena" que publica en el Journal o Protozoology (Sagan L., 1965a). A estas alturas tiene claro que los cloroplastos (y las mitocondrias) tienen ADN propio y que son orgánulos autónomos (Sagan L. et al., 1965b).

Desde el punto de vista personal, la estancia en la Universidad de Madison y su traslado a Brandeis coinciden con su primer divorcio. El exceso de trabajo, la atención a sus dos hijos de corta edad y a un no menos demandante marido, hacen que el matrimonio se rompa definitivamente en 1964. Lynn Margulis siempre reconoció la enorme influencia intelectual que ejerció Carl Sagan sobre ella. Tras el divorcio se mantuvieron en contacto a nivel profesional y personal, y su amistad duró hasta la muerte de este último en 1996 (Properzio, 2004).

Desarrollo y consolidación de la Teoría de la Endosimbiosis Seriada

Una vez doctorada, Lynn se incorpora al Departamento de Biología de la Universidad de Boston (Massachusetts), en la que permanecerá más de 20 años compaginando la docencia y la investigación. Fruto de esta etapa profesional son algunas de sus más célebres producciones científicas. Dos años después de obtener el doctorado -había cumplido 29 años- publica "On the origin of

mitosing cells -Sobre el origen de las células mitóticas-" (Fig. 3). La tarea no fue fácil porque el escrito de ¡más de cincuenta páginas! fue rechazado por 15 revistas hasta verse publicado (Sagan, 1967). Este artículo sirvió de base para su primer y renombrado libro "Origin of eukaryotic cells -El origen de las células eucariotas-" (Margulis, 1970).

En ambos trabajos hace una exposición teórica sobre el mecanismo de la endosimbiosis como origen de las células eucariotas. Según esta teoría la primera célula eucariota apareció como resultado de la "fusión" simbiótica de varias bacterias preexistentes. El primer evento de simbiosis tendría lugar entre una arqueobacteria del tipo *Thermoplasma acidophilum* y bacterias móviles microaerófilas del tipo espiroqueta como *Leptospira*. Esta sería la célula eucariota primigenia de tipo mastigoto (protozoo ciliado de la Clase Mastigophora) en la que la arquea proporcionaría el nucleocitoplasma y la espiroqueta el undulipodio, la estructura microtubular de movilidad, incluido el cinetosoma. Posteriormente, las proteínas que forman los microtúbulos (tubulinas) acabarían formando el huso mitótico y una versión del cinetosoma, los centriolos, lo que daría lugar a la aparición de la mitosis y más tarde la meiosis y la reproducción sexual (Sagan, 1967; Margulis, 1970).

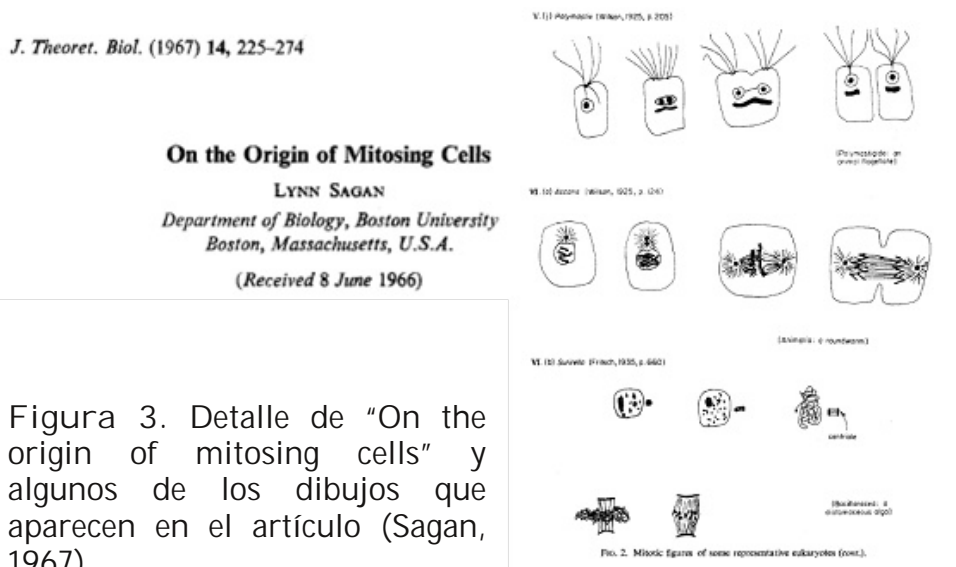


Figura 3. Detalle de "On the origin of mitosing cells" y algunos de los dibujos que aparecen en el artículo (Sagan, 1967).

En un segundo evento de simbiosis, el mastigoto se uniría con una bacteria aerobia que acabaría convirtiéndose en la mitocondria. Por último algunas células eucariotas con mitocondrias establecerían simbiosis con cianobacterias fotosintéticas para dar lugar a los cloroplastos, y por tanto, a las células eucariotas con capacidad fotosintética. Cuatro tipos de bacterias diferentes que en el curso de tres eventos de simbiosis originan la célula eucariota en un lapso de unos 600 m.a comprendido entre los 1200 m.a y los 600 m.a (Sagan, 1967; Margulis, 1970).

Lynn Margulis no defiende una teoría totalmente nueva. El origen endosimbiótico para la célula eucariota es una idea heredera de varios trabajos previos de mediados del siglo XIX y principios del XX. Lo que aporta de nuevo son argumentos (propios y ajenos) de tipo bioquímico, citológico y paleontológico en apoyo de la teoría (Sagan, 1967 y referencias citadas). En una retrospectiva sobre la vida de Lynn Margulis, firmada por su colega y amigo Moselio Schaechter, éste acierta al decir que aunque la ciencia progresa a través de la experimentación, los resultados experimentales adquieren utilidad cuando son escrutados, interpretados y organizados, y en esa actividad Lynn Margulis había sido una auténtica maestra (Schaechter, 2012).

A partir de este momento Lynn Margulis y la teoría de la endosimbiosis seriada, como la bautiza el protistólogo Max Taylor (1974), aparecerán unidas para siempre. Como muchos de sus colegas admiten, uno de los rasgos más prominentes de la actividad científica de Lynn Margulis es la determinación en la defensa de sus ideas. En un principio, la teoría tuvo que luchar contra el poco crédito científico que se le otorgaba. Su formulación implicaba varios procesos súbitos, enormes, de cambio genético (la asimilación por simbiosis de genomas completos) para explicar, nada menos, que el origen de las células eucariotas. Por tanto, el mecanismo evolutivo que generó la célula eucariota no fue la selección natural trabajando sobre mutaciones espontáneas, sino la simbiosis. La selección natural en todo caso sirvió para ajustar el resultado (Sampedro, 2002). Estamos por tanto ante un mecanismo no darwiniano de evolución.



Figura 4. Lynn Margulis en su laboratorio de la Universidad de Boston, años 80. Tomado de Boston University Photography.

Como tal, su teoría encontró una oposición tremenda entre el neodarwinismo imperante, que no admitía nada diferente al trabajo de la selección natural sobre mutaciones espontáneas como causa para la aparición de nuevas especies y taxones de orden superior (Sampedro, 2002). Desde su

publicación en 1967 (Sagan, 1967), habrían de pasar 10 años hasta que la teoría de la endosimbiosis seriada pasara a formar parte del núcleo central de la biología moderna. A partir de los años 70 comienza a tener eco entre la comunidad científica, y diversos trabajos sobre biología molecular, genética y ultraestructura de diferentes tipos de células eucariotas apoyan su origen endosimbótico (Margulis, 1998; 2002). Pero es en 1978 cuando se produce un hito fundamental para la aceptación de la teoría de la endosimbiosis seriada: se publica un trabajo clásico en el que utilizando herramientas de análisis de proteínas y DNA, se prueba concluyentemente el origen endosimbionte de los cloroplastos y las mitocondrias (Schwartz y Dayhoff, 1978).

Curiosamente, el principal escollo para aceptar la teoría de la endosimbiosis seriada tal como la formula Lynn Margulis, es la demostración del primer evento de simbiosis. La conexión entre undulipodios y espiroquetas es débil, ya que no existe homología estructural entre ellos, y la formación del núcleo como resultado del proceso de endosimbiosis no tiene muchos adeptos. Para muchos científicos la primera célula nucleada, con movilidad, mitosis y meiosis apareció gradualmente por evolución darwiniana a partir de una arqueobacteria (Sampedro, 2002). Con o sin aceptación, en su versión original o modificada, hoy en día la teoría de la endosimbiosis seriada es aceptada y forma parte de todos los libros de texto modernos sobre Biología.

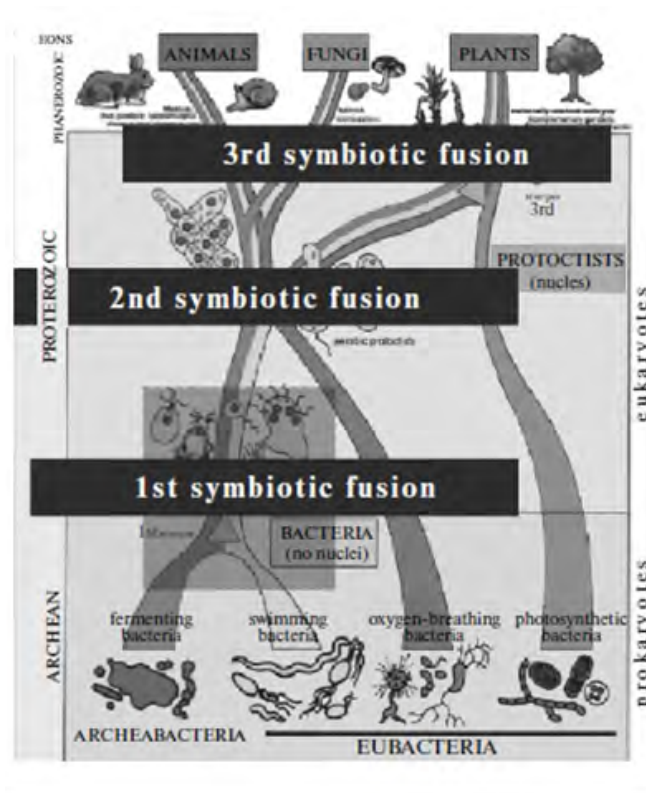


Figura 5. Esquema de los tres eventos de simbiosis que predice la Teoría de la Endosimbiosis Seriada (Margulis, 2010).

Más allá de la Teoría de la Endosimbiosis Seriada

La teoría de la endosimbiosis para el origen de las células eucariotas se extiende más allá del ámbito de la evolución celular temprana, e irradia en distintos campos de la biología. Por ejemplo, Lynn Margulis considera que la simbiosis es el motor de la evolución (Margulis, 1998) y con ello recupera las ideas de Boris Kozo-Polyansky, quien en 1924 ya apunta a la “simbiogénesis” como un mecanismo evolutivo de primer orden (Kozo-Polyansky, 1924). Lynn Margulis es toda una especialista en resucitar, rejuvenecer y dar sentido a viejas ideas desechadas; lo había hecho con Merechowsky y Wallin y lo vuelve a hacer con Kozo-Polyansky.

Lynn Margulis cree que la simbiogénesis puede ser el mecanismo que explique la adquisición de ciertas estructuras complejas como los flagelos eucariotas, la capacidad de fotosintetizar, la mitosis o la meiosis (Margulis, 2002, 2010). En este punto es donde Lynn Margulis encuentra más detractores porque muchos de sus colegas, aun aceptando parcialmente la teoría de la endosimbiosis, no creen que el papel de la simbiogénesis sea relevante para el proceso evolutivo. Más bien lo consideran una anécdota afortunada que necesita una explicación darwiniana (Maynard Smith y Szathmáry, 1999).



Figura 6. Junto a otros científicos eminentes, Lynn Margulis (en el centro) y James Lovelock (tercero por la dcha.) reciben el reconocimiento de la NASA por su contribución a la astrobiología. Tomado de Bill Ingalls/NASA.

Como extensión de la idea de la simbiogénesis, Lynn Margulis es coautora de la hipótesis Gaia (Lovelock y Margulis, 1974 a, b) inicialmente

propuesta por James Lovelock (Lovelock, 1972). Esta teoría postula que la vida en la tierra es un producto de la simbiosis entre organismos y planeta. Se propone que una vez dadas las condiciones para que surgiera la vida, la comunidad de seres vivos ha determinado el clima y la composición química del planeta para hacerlos favorables a la propia existencia de la vida (Lovelock, 1972).

Lynn Margulis conoce la teoría en 1971 de boca del propio Lovelock que le consulta sobre la posibilidad de que las enormes cantidades de metano de la atmósfera terrestre puedan ser resultado de la actividad bacteriana. Rápidamente acepta los postulados de Lovelock, que toma como una extensión a escala planetaria de sus ideas sobre la simbiosis y el proceso evolutivo. A lo largo del tiempo Lynn se convierte en una de las más activas defensoras de la teoría Gaia, contribuyendo a su difusión y replanteamiento. En uno de sus libros más conocidos, Lynn Margulis explica que la hipótesis Gaia no pretende asimilar la Tierra a un organismo vivo, sino que propone que la biosfera tiene algunas características de organismo. Está constituida en gran medida por células (sobre todo bacterias) que se reproducen, asimilan nutrientes, producen desechos e interaccionan con otras (Symbiotic Planet, 1998).

En el campo científico de la sistemática, el origen endosimbiótico de las células eucariotas introdujo un cambio claro de paradigma. La principal división no podía ser entre animales y plantas, sino entre procariotas y eucariotas. Tomando como base los trabajos de Copeland (1956) y de Whittaker (1969) en los que se propone la clasificación de los seres vivos en cuatro (moneras, protistas, animales y plantas) o cinco reinos (a los anteriores hay que añadir los hongos separados de las plantas) respectivamente, Lynn Margulis y el propio Whittaker proponen la creación de dos Superreinos, procariota y eucariota, y la redefinición del Reino Protista (Whittaker y Margulis, 1978).

Unos cuantos años después, en 1982, L. Margulis publica junto con Karlene Schwartz el famoso "Five Kingdoms – Los cinco Reinos-" (Fig. 7). En esta obra proporcionan un punto de vista evolutivo a la clasificación de los seres vivos y proponen una nueva reorganización del reino protista, que circunscriben a las algas y mixomicetos. El resto de organismos, considerados como protistas hasta ese momento, son redistribuidos entre los otros cuatro reinos (Margulis y Schwartz, 1982).

Figura 7. Portada de la tercera edición (1997) de "Five Kingdoms" prologada por S. Jay-Gould. Tomado de <http://us.macmillan.com/splash/academic/index.html>.



A la etapa de Lynn Margulis en Boston también corresponde la primera obra en la que colabora con su hijo Dorian Sagan (Fig. 8). Se trata de "Origins of sex: three billion years of genetic recombination" (Margulis y Sagan, 1986). En esta obra amplía la teoría de la endosimbiosis seriada para dar una explicación del origen de la mitosis, meiosis y la conexión entre endosimbiosis y reproducción sexual. La colaboración literaria entre madre e hijo se mantendría fructífera durante años ya que publicarán juntos un total de 8 libros, algunos

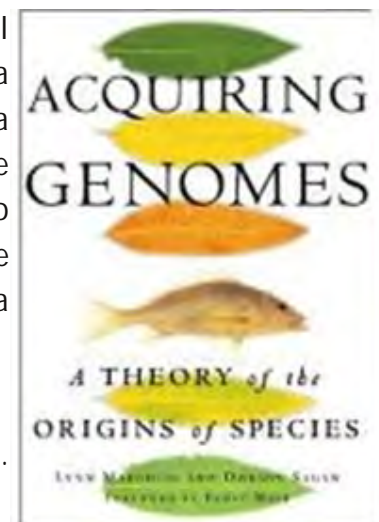


tan deliciosos como "Acquiring genomes" (Margulis y Sagan, 2002), prologado por Ernst Mayr (Fig. 9). En el año 2007 aparece el último texto que firman conjuntamente (Margulis y Sagan, 2007).

Figura 8. Lynn Margulis y Dorian Sagan. Madre e hijo firmaron varios libros juntos, una simbiosis literaria muy fecunda. Tomado de UMASS Photo Services.

Durante los primeros años de estancia en la Universidad de Boston, Lynn conoce al que será su segundo marido, el cristalógrafo Thomas N. Margulis. Se casan en 1967 y tienen dos hijos Zachary (1967) y Jennifer Margulis (1969). Una constante en la vida de Lynn Margulis, yo diría que en la de muchas de las mujeres dedicadas a la ciencia, es la dificultad para compaginar la vida profesional y personal. Lynn Margulis es en estos momentos una científica de reconocido prestigio, líder en su campo y está al cargo de una familia de cuatro hijos. Ella misma confiesa que "no es humanamente posible ser una buena esposa, buena madre y un científico de primera clase. Nadie puede hacer esto, de algo tienes que prescindir" (Properzio, 2004). Por lo que parece, decide prescindir de su papel de esposa ya que su segundo matrimonio concluye en 1982.

Figura 9. Portada de "Acquiring genomes". Tomado de Amazon.com.



La Etapa en Massachusetts

Tras 22 años vinculada a la Universidad de Boston, Lynn Margulis se traslada a la que iba a ser su casa hasta el momento de su muerte. Se une al Departamento de Biología de la Universidad de Massachusetts (Amherst),



donde acabaría siendo nombrada Catedrática Honoraria de Geociencias. Comienza a recoger los frutos de su exitosa carrera científica. En 1983 entra a formar parte de la Academia Nacional de las Ciencias de los Estados Unidos y posteriormente en la Academia Rusa de las Ciencias Naturales. En 1999 recibe la Medalla de Oro de la Academia de Ciencias Americana, y en 2008 la medalla Darwin-Wallace por la Sociedad Linneana de Londres. Es mentora de la Universidad de Boston y sus publicaciones originales están custodiadas en la biblioteca del Senado de los EUA.

A lo largo de los últimos veinte años, Lynn Margulis mantiene una intensa colaboración científica con las Universidades de Valencia y Autónoma de Barcelona (UAB), donde fue profesora visitante a mediados los años ochenta. Participa en varios proyectos de investigación sobre la diversidad microbiana de las comunidades fotosintéticas anaeróbicas en el lago de Banyoles y Delta del Ebro y publica numerosos artículos junto al profesor Ricardo Guerrero (Catedrático de Microbiología de la UAB), con quien desde el año 2000 mantiene una relación sentimental. Es Doctora Honoris Causa por las Universidades citadas, además de por la Universidad Autónoma de Madrid y la de Vigo.

Continúa publicando activamente artículos de investigación, revisiones y libros. Una de las tareas que le ocupan con mayor dedicación es la demostración del talón de Aquiles de su teoría, que los flagelos de las células eucariotas tienen un ancestro en la espiroquetas (Wier et al., 2010). Al final de su vida científica ha publicado en torno a 300 artículos y es autora o coautora de 17 libros, algunos de ellos tan populares como "Los Cinco Reinos" o "Planeta Simbiótico" o "Captando Genomas".

Hasta sus últimos días mantuvo el torrente de vitalidad que siempre caracterizó su vida profesional y personal. Gustaba de madrugar, montar en bicicleta, patinar y bañarse en las aguas del río que discurría cerca de casa. Mientras trabajaba en el despacho de su casa sufre un derrame cerebral severo. Cinco días después, el 22 de noviembre de 2011, muere en el hospital; tenía 73 años.

En Marzo de 2012, unos meses después de su muerte, la comunidad científica le rinde un homenaje a través de la celebración de un Simposium monográfico sobre su vida y obra (Fig 10).

Como concluye Schaechter en su retrospectiva sobre la vida de esta brillantísima bióloga, "en algunas ocasiones, las ideas que expuso causaron el desmayo entre sus colegas y amigos. Pero para aquellos que la conocimos, este no es su legado más relevante. Debería ser recordada como una persona cuyas creencias apasionadas e ideas creativas cambiaron el discurso de la ciencia en varias áreas. De esta forma llegó a conectar con muchas personas, tanto de

ciencia como no" (Schaetchter, 2011). Desde luego ese es mi caso, sirvan estas torpes letras para expresar mi más rendida admiración a esta fascinante científica y mujer.

Figura 9. Cartel anunciador del simposio en memoria de Lynn Margulis, celebrado en marzo de 2012. Tomado de Universidad de Massachusetts (http://www.geo.umass.edu/margulis_symposium.html).



Bibliografía

- Copeland, H.F. 1956. *The Classification of Lower Organisms*. Palo Alto, CA: Pacific Books.
- Kozo-Polyansky, B.M. 1924. *Novyi printzip biologii. Ocherk teorii simbiogeneza*. Puchina, Lenigrad. Moscow [Traducido al inglés en: "Kozo-Polyansky, B.M. 2010. *Symbiogenesis: a new principle of evolution*. Translation from the Russian by V. Fet (V. Fet y L. Margulis, eds.). Harvard Univ. Press, Cambridge"].
- Lake, J.A. 2011. Lynn Margulis (1938-2011). Biologist who revolutionized our view of early cell evolution. *Nature*. 480:458.
- Lovelock, J.E. 1972. Gaia as seen through the atmosphere. *Atmospheric Environment*. 6:579-580.
- Lovelock, J.E. y Margulis L. 1974a. Homeostatic tendencies of the Earth's atmosphere. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. 5:93-103.
- Lovelock J.E. y Margulis L. 1974b. Atmospheric homeostasis by and for biosphere -Gaia hypothesis-. *Tellus*. 26:2-10.
- Maynard Smith. J. y Szathmáry, E. 1999. *The Origins of Life: From the Birth of Life to the Origin of Language*. Oxford: Oxford University Press.
- Merechowsky, M. 1910. *Cell in Development and heredity* (EB Wilson, ed) MacMillan, NY.
- Margulis, L. 1970. *Origin of Eukaryotic Cells: Evidence and Research of Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant and Animal Cells on the Precambrian Earth*. Yale University Press.



- Margulis, L. 1998. *Symbiotic Planet*, Sciencewriters, Massachusetts [Traducido como "Planeta Simbiótico. 2002. Un nuevo punto de vista sobre la evolución. Ed. Debate"].
- Margulis, L. 2010. Symbiogenesis. A new principle of evolution rediscovery of Boris M. Kozo-Polyansky (1890-1957). *Paleontological Journal*. 44:1525-1539.
- Margulis, L. y Sagan, D. 1986. *Origins of Sex. Three Billion Years of Genetic Recombination*, Yale University Press.
- Margulis, L. y Sagan, D. 2002. *Acquiring genomes: a theory on the origin of species*, Basic Books [Traducido como "Captando genomas. 2003. Ed. Kairos"].
- Margulis, L. y Sagan, D. 2007. *Dazzle Gradually: Reflections on the Nature of Nature*, Sciencewriters Books.
- Margulis, L. y Schwartz, K.V. 1982. *Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on earth*, New York: WH Freeman. [Traducido como "Cinco reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la Tierra. 1985. Editorial Labor"].
- Plaut, W. y Sagan, L. 1958. Incorporation of thymidine in the cytoplasm of *Amoeba proteus*. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 4:843-847.
- Properzio, J. 2004. Lynn Margulis. Full speed ahead. *University of Chicago Magazine*.
- Schwartz, R.M. y Dayhoff, M.O. 1978. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science*. 199:395-403.
- Sagan, L. 1965a. An unusual pattern of tritiated thymidine incorporation in *Euglena*. *Journal of Protozoology*. 12:105-ss.
- Sagan, L., Ben-Shaul, Y., Epstein, H.T. y Schiff, J.A. 1965b. Studies of chloroplast Development in *Euglena* XI. Radioautographic Localization of Chloroplast DNA. *Plant Physiology*. 40:1257-1260.
- Sagan, L. 1967. On origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology* 14:225-274.
- Sampedro, J. 2002. *Deconstruyendo a Darwin*. Ed. Crítica, Barcelona.
- Schaechter, M. 2012. Lynn Margulis (1938-2011): Retrospective. *Science*. 335:302.
- Taylor, F.J.R. 1974. Implications and extension of the serial endosymbiosis theory of the origin of eukaryotes. *Taxon*. 23:229-258.
- Wallin, I. 1927. *Symbiogenesis and the origin of species*. London: Blliere, Tindall & Cox.
- Whittaker, R.H. 1959. New concepts of kingdoms of organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the

traditional two kingdoms. Science. 163:150-160.

Whittaker, R.H. y Margulis, L. 1978. Protist classification and the kingdoms of organisms. Biosystems. 10:3-18.

Wier, A.M., Sacchi, L., Dolan, M.F., Bandi, C., McAllister, J. y Margulis, L. 2010. Spirochete attachment ultrastructure: implications for the origin and evolution of cilia. Biological Bulletin. 218:28-35.



Antonio Encina García es Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad del León (2000). Tras una experiencia post-doctoral en la Universidad de Edimburgo se reincorpora a la Universidad de León como profesor del Área de Fisiología Vegetal en el año 2002. Desde entonces imparte docencia en Licenciaturas y Grados en Biología y Biotecnología, así como en los Máster "Metodología de Investigación en Biología Fundamental y Biomedicina" e "Ingeniería de Biosistemas". Su principal actividad investigadora se centra en el estudio de la

estructura y composición de las paredes celulares de las plantas. Ha publicado más de una treintena de trabajos en revistas y libros científicos y ha participado en más de una decena de Proyectos de Investigación de ámbito local, nacional e internacional. Es miembro del Consejo Editorial de la revista AmbioCiencias.

MI PROYECTO DE TESIS

Riqueza de macroinvertebrados litorales de lagunas de montaña:
factores determinantes y patrones espaciales

Carlos Martínez Sanz

Área de Ecología. Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental.
Universidad de León

Los lagos de montaña son ecosistemas poco conocidos, particularmente en España. Y es difícil conservar o gestionar aquello que no se conoce. La presión externa para desprenderse de este lastre de ignorancia ha aumentado en la última década debido, entre otras cosas, a la creciente evidencia (a partir de estudios europeos) de la importancia de las pequeñas masas de agua como refugios de biodiversidad y, en el plano normativo, a la aprobación en el año 2000 de la Directiva Marco del Agua. Tal conjunto de circunstancias impulsó a investigadores del área de Ecología a abordar una sucesión de estudios, de carácter eminentemente preliminar, destinados a caracterizar estos ecosistemas y su biota. La tesis doctoral gira en torno a dos palabras clave, macroinvertebrados y riqueza. Macroinvertebrados, porque apenas existían datos sobre ellos en lagunas de montaña españolas y solo recientemente en sistemas europeos equivalentes. Riqueza, por tratarse de un parámetro básico de la comunidad, de gran importancia y tradición ecológica y que proporciona una buena aproximación a la respuesta funcional de la comunidad al medio; por añadidura, ocupa un lugar destacado en biología de la conservación. Hay que recordar que por macroinvertebrados, se entiende un conjunto de invertebrados de talla relativamente grande (por encima de 3 mm, podríamos decir en una burda generalización) y hábitos bentónicos; y que el término riqueza, de forma genérica, alude al número de taxones presentes en una comunidad o muestra. En su acepción más típica, estos taxones son especies, pero no siempre es así.



En esta tesis, el nivel taxonómico de resolución ha sido el de género, con algunas excepciones. La necesidad de trabajar con estadios juveniles y la dificultad o imposibilidad de identificar muchos de ellos hasta especie hacen recomendable uniformizar los datos a un nivel superior.

Figura 1. Ninfa de *Boyeria irene*, una de las especies de odonato presentes en el lago de Sanabria.

La investigación, en su conjunto, se ha desarrollado a partir de datos recogidos entre 2004 y 2008 en 55 lagunas de montaña, todas ellas en Castilla y León, y en el lago de Sanabria. Se han identificado 143 taxones (géneros, en su mayor parte), lo que constituye el primer inventario regional de macroinvertebrados litorales de lagos de montaña castellanoleonés.

El primer problema al que se enfrenta el ecólogo en un estudio como el presente es la imposibilidad práctica de medir la riqueza con exactitud. En palabras sencillas, cuando damos un valor de riqueza a partir de una muestra o de un conjunto de ellas (la denominada riqueza observada), estamos subestimando la riqueza real de la comunidad. Los científicos han tratado de resolver el problema recurriendo a artificios matemáticos: los estimadores de riqueza. Son herramientas que, a partir de unos datos reales, proporcionan un valor estimado de la riqueza real. Existe un amplio repertorio de ellos y los resultados varían de unos a otros. ¿Cuál es el más adecuado? No existe una respuesta única. Por ello, el primer paso de la tesis consistió en probar un amplio número de estimadores para seleccionar aquellos que operaban mejor en estos sistemas (lagunas de montaña) y para estos organismos (macroinvertebrados litorales). De aquí surge la primera recomendación derivada de la investigación: para estimar riqueza de macroinvertebrados litorales, parece recomendable utilizar el estimador conocido como Jackknife 2 (en el caso de que contemos con varias muestras de una misma laguna) o de Chao 1 (si solo contamos con una). Disponemos ya de una herramienta para

usar en el futuro cuando se estime oportuno.



Figura 2. El autor de la tesis recogiendo muestras de macroinvertebrados litorales.

En segundo lugar, la inmediata preocupación del ecólogo de comunidades: ¿de qué factores depende la estructura de la comunidad? Mediante regresión lineal múltiple se elaboró un modelo matemático que ofrecía una idea global de cuáles de una serie de factores estaban relacionados con la riqueza. Existen estudios precedentes, aunque apenas unos pocos, que tratan el asunto para factores concretos. Aquí se abordó un enfoque más global.

Se seleccionó un elevado número de características potencialmente relacionadas con la riqueza, según bibliografía (altitud, nutrientes, superficie, profundidad, conductividad, heterogeneidad ambiental, densidad de peces, persistencia de la lámina de agua, entre otras muchas), para comprobar estadísticamente cuál o cuáles eran más relevantes en nuestra área de estudio. Las únicas variables significativamente relacionadas con la riqueza resultaron ser la heterogeneidad, medida como número de ambientes muestreados en cada laguna, y un índice cualitativo que daba idea de la intensidad de las introducciones de peces en cada una. La expresión matemática del modelo resultante ofrece una herramienta para predecir valores de riqueza en nuevos sistemas. Aplicada a un conjunto independiente de lagunas (n=12) se comprobó mediante ANOVA que los valores de riqueza predichos por el modelo no diferían significativamente de los medidos realmente. Hay varias ideas de interés asociadas a estos resultados. Una muy importante es la evidencia de que un impacto, la introducción de peces (pues, esencialmente, todos los peces que hay en nuestras pequeñas lagunas de montaña son introducidos), puede tener un efecto muy notable sobre la comunidad, con una importancia relativa superior a la de la mayoría de los factores naturales. Otra, la constatación de que algunas de las ideas ampliamente aceptadas en limnología no se cumplen en nuestro caso, como la relación entre altitud o superficie y riqueza.



Figura 3. Aproximación a las lagunas de El Trampal, en el extremo occidental de la sierra de Gredos.

La evidencia del peso relativo del factor "peces", así como su importancia en gestión, invitaba a un análisis más detallado de un subconjunto de los datos. Seleccionando aquellas lagunas con mayor nivel de impacto piscícola y otras, próximas, sin peces, se comprobó su efecto sobre la composición (ya no simplemente la riqueza) de la comunidad. Tres grupos taxonómicos demostraron ser particularmente sensibles a esta alteración del ecosistema:

Coleoptera, Heteroptera y Trichoptera, tres órdenes de insectos caracterizados por un tamaño relativamente grande y, los dos primeros, por una elevada capacidad natatoria.

La última parte de la tesis aborda aspectos más complejos de ecología espacial, aunque de larga tradición. Uno de los grandes debates de la ecología de comunidades, originado poco después de que MacArthur y Wilson propusieran su teoría biogeográfica de islas, ha sido el siguiente: ¿qué albergará más especies, un ecosistema grande o varios pequeños? Las teorías tradicionales, basadas en la conocida relación entre superficie y riqueza (a mayor superficie, mayor riqueza), apostaban por los sistemas de gran tamaño. No obstante, un conjunto de sistemas pequeños, cada uno con relativamente pocas especies, puede tener en conjunto un número notablemente grande de taxones (un valor de riqueza regional elevado, decimos). El debate tiene una aplicación directa en biología de la conservación; por ejemplo, en el diseño de espacios naturales. Nosotros podíamos abordar la cuestión en el parque natural de Sanabria, dentro del cual teníamos información faunística de un gran lago (el lago de Sanabria, con algo más de 3 km² de superficie) y de 17 pequeñas lagunas (con una superficie acumulada inferior a 0,7 km²). La riqueza observada en el conjunto de las lagunas (111 géneros) fue considerablemente superior a la del lago (81 géneros), aunque individualmente todas tenían riquezas inferiores (siempre menos de 48). No conocemos la explicación de estos patrones espaciales, pero se pueden hacer conjeturas. Primero, parece existir cierta relación entre superficie y riqueza (el lago de Sanabria tiene más especies que cualquiera de las lagunas). Segundo, la elevada riqueza regional del conjunto de lagunas podría deberse a su heterogeneidad ambiental (a la existencia de lagunas con características diferentes). En tercer lugar, una dinámica de metacomunidades, con eventos de extinción y colonización, podría generar un mosaico de lagunas de composición taxonómica diferente y, en conjunto, de elevada diversidad. Sea cual sea la explicación, estos resultados muestran la relevancia de conjuntos de sistemas lacustres en conservación, detalle no recogido por la actual legislación europea.

Bibliografía

- Martínez-Sanz, C., F. García-Criado, C. Fernández-Aláez & M. Fernández-Aláez, 2010. Assessment of richness estimation methods on macroinvertebrate communities of mountain ponds in Castilla y León (Spain). *Annales de Limnologie – International Journal of Limnology* 46: 101-110.
- Martínez-Sanz, C., C. Fernández-Aláez & F. García-Criado, 2012. Richness of littoral macroinvertebrate communities in mountain ponds from NW Spain: what factors does it depend on? *Journal of Limnology* 71: 154-163.

Martínez-Sanz, C., F. García-Criado & C. Fernández-Aláez, 2010. Effects of introduced salmonids on macroinvertebrate communities of mountain ponds in the Iberian system of Spain. *Limnetica* 29: 221-232.

Martínez-Sanz, C., C.S.S. Cenzano, M. Fernández-Aláez & F. García-Criado, 2012. Relative contribution of small mountain ponds to regional richness of littoral macroinvertebrates and the implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 22: 155-164.

Directores de la tesis

- Dra. Camino Fernández Aláez
- Dra. Margarita Fernández Aláez
- Dr. Francisco García Criado

Galería de fotos



Foto tomada a orillas de la laguna de Fuentescarrionas (norte de Palencia) durante la campaña de muestreo de 2007. El autor de la tesis, Carlos Martínez (izqda.) junto a Francisco García (codirector de la tesis) y Rocío Pozo.

AMBIOLOGOS DE AQUÍ

30 años: de la Facultad virtual a la prima de riesgo

Antonio Javier Lucio Calero

En este año 2012 se cumplen 30 años de mi promoción en la Facultad de Biología, una de las pioneras en algo que ahora es cotidiano: las universidades virtuales. Me explico. En aquellos años la Facultad de León era virtual, pero no porque se ofreciesen cursos on-line ni porque se colgase información en la nube; la cosa era más artesanal: no teníamos Facultad y recibíamos las clases hoy en la antigua Facultad de Veterinaria, mañana en la Escuela de Agrícolas, al otro en la Escuela de Minas; visto de otra forma, la Facultad éramos solo las



personas, lo que no deja de tener su enjundia. Cuando ya estábamos en 5º curso, tuvimos la oportunidad de estrenar la recién inaugurada Facultad de Biología que fue una de las primeras en instalarse en las campas, hasta entonces desiertas, de Vegazana.

Foto. A. Lucio, autor del artículo.

Y a pesar de los evidentes déficits de medios materiales, recuerdo aquellos años de la Facultad con el barniz de nostalgia positiva con el que tendemos a recubrir el pasado. Me licencié en el año 1982, y toda mi formación investigadora se realizó en el Departamento de Biología Animal bajo la tutela, primero, y la amistad, enseguida, de Pancho Purroy, a mi juicio una persona clave para la Facultad, además de un ejemplo de compromiso profesional y social.

Mi relación con la Facultad se prolongó durante casi 12 años, primero los cinco de carrera y luego la etapa de formación predoctoral; en ese período hay claros y oscuros, como cabe esperar en la vida de cualquier persona, pero el balance se inclina sin duda alguna hacia lo positivo. Hablar de "Facultad" es hablar de profesores, personal de administración y servicios y compañeros de estudios; muchos nombres se agolpan en mis recuerdos, tanto por su valor humano como por su contribución de una u otra forma a mi formación personal y profesional.

Nada más leer la tesina de licenciatura (sobre la población de avutardas



de León), me integré en un equipo liderado por Pancho y del que formamos parte un grupo de amigos cuya mejor virtud es seguir siéndolo hoy, pasados 30 años: Mario, Ordoño y Luis; ellos, junto con otros compañeros entrañables como Patxi e Isma, forman parte de una de las mejores etapas de mi vida. Conseguimos financiación para proyectos de investigación centrados en la fauna de vertebrados, singularmente en la gestión de poblaciones de especies cinegéticas, un terreno entonces vedado para los biólogos y monopolio de otras profesiones, y en el que nuestra llegada fue recibida con recelo por ser, no por estar, demasiado “verdes”. Además tuve la oportunidad de colaborar con otros proyectos del Departamento, como los estudios sobre oso pardo o urogallo, que me ayudaron a conformar una base de conocimientos que me serían muy útiles más adelante.

Leí la tesis doctoral en el año 1989 sobre gestión de poblaciones de perdiz roja, bajo la dirección de Pancho y, tras unos meses de depresión posparto, me lancé con mi colega y amigo Mario a la aventura empresarial. Montamos una empresa que hoy, 20 años después, ya bajo la única dirección de Mario y quizá precisamente por eso, sigue viva y en activo.

El paso por la Facultad consolidó en mí un interés por la investigación y la docencia que sigo manteniendo en la actualidad. En 1995 aproveché la ocasión de la oferta de una plaza de profesor titular en la Universidad de Valladolid, en concreto en la Escuela de Ingenierías Agrarias de Palencia que tenía recién implantada la titulación de ingeniero de montes; me presenté al concurso para la interinidad primero y a la oposición después, y logré obtener el puesto. Fueron nueve años enormemente enriquecedores y un ejemplo más de que la diversidad de enfoques y perfiles profesionales es siempre positiva. Aprendí muchísimo de mis alumnos de 5º de ingeniería de montes y confío que ellos también aprendieran algo del “biólogo”. Incluso en Palencia la presencia de León era intensa pues mis compañeros de área eran leoneses y de la Facultad: Luis Felipe, excelente profesional y persona ahora de vuelta a la docencia en León; Ángel (el rey de los alcaudones) y Merche (otra leonesa de la cantera de estupendos biólogos del Departamento de Biología Animal).

La Facultad también me marcó en otro aspecto; en ella conocí a principios de los 80 a Cristina, mi compañera desde entonces, también bióloga y que es la causa de que, ya a partir de 1990, gran parte de mi vida personal se haya desarrollado en Cantabria. El cansancio de una vida itinerante entre Palencia y Cantabria, me llevó en 2003 a presentarme, otra vez, a unas oposiciones, en este caso al Cuerpo Facultativo Superior de la Administración Regional de Cantabria. Y aprobé. Pedí la excedencia en mi trabajo universitario, al que echo de menos dos días de cada tres, y me instalé ya definitivamente en Cantabria.



Desde entonces mi labor profesional se ha dedicado a otra faceta de la conservación de la naturaleza: más tiempo dedicado a la planificación, a la organización de personal o la aplicación de las normativas. He trabajado durante seis años como Subdirector General de Biodiversidad del Gobierno de Cantabria y en la actualidad lo hago como Jefe del Servicio de Conservación de la Naturaleza, con un equipo multidisciplinar de biólogos, ingenieros de montes, ingenieros técnicos forestales y jurídicos que nos dedicamos a la gestión de espacios protegidos, especies amenazadas, caza y pesca continental. Y de vez en cuando vuelvo por unas horas al mundo universitario, tanto a la Facultad de León como a otras universidades, a participar en tribunales de tesis o en jornadas de diversa índole.

Escribía Edward O. Wilson en "La diversidad de la vida": "Cada país tiene tres formas de riqueza: material, cultural y biológica. Las dos primeras las comprendemos bien porque son la sustancia de nuestra vida cotidiana. La esencia del problema de la biodiversidad es que la riqueza biológica se toma mucho menos seriamente. Este es un error estratégico grave, error que lamentaremos cada vez más a medida que el tiempo pase".

En nombre de la riqueza material se han arrasado históricamente recursos culturales y naturales; hoy en día, para no soliviantar a la prima de riesgo se vuelve a considerar a la inversión en educación e investigación como un "gasto", o a la conservación de la biodiversidad poco menos que una frivolidad. No quisiera que este artículo se limitase al relato de mis recuerdos y vivencias. Las circunstancias me exigen, espero que con la benevolencia de los editores, finalizarle reivindicando mi condición de funcionario público en nombre de tantos funcionarios ejemplares que he conocido a lo largo de mi vida en la Universidad y en otras Administraciones; reivindicando la educación pública que permitió que el hijo de un obrero pudiera realizar estudios universitarios; reivindicando la educación y la investigación como las armas de futuro de una sociedad; y, por supuesto, reivindicando la conservación de nuestra diversidad biológica como herramienta de progreso social y de justicia con las generaciones futuras.



DE TODO UN POCO

Celebración de San Alberto Magno 2011

La Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales (FCCBA) desarrolló entre los días 10 y 18 de noviembre de 2011 las actividades organizadas con motivo de la festividad de su patrono San Alberto Magno, entre ellas las siguientes conferencias:

- "El bioquímico en la cocina." Dr. Félix Goñi Urcelay, Catedrático de Bioquímica de la Universidad del País Vasco.
- "Los bosques en la cultura tradicional leonesa." D. Emilio Gancedo Fernández, periodista y escritor.
- "Atapuerca, en la encrucijada de la prehistoria de Europa." Dr. Iñigo Martínez Mendizábal, Profesor Titular de Paleontología de la Universidad de Alcalá de Henares.
- "Las matemáticas en la vida cotidiana." Dr. José María Barja Pérez, Catedrático de Álgebra de la Universidad de La Coruña.
- "La química verde y la Biotecnología." Dr. José Luis García López, Profesor de Investigación del CSIC.

También tuvo lugar una jornada de puertas abiertas el día 17 para visitar la exposición "Mamíferos de cerca" organizada por el servicio de colecciones zoológicas de la Universidad de León (CZULE).

Por último, el 18 de noviembre se celebró el Acto Académico de conmemoración de nuestro patrono, en el Aula Magna San Isidoro del Albeitar, durante el que se impusieron insignias a los Licenciados y alumnos de Máster que finalizaron sus estudios en el curso 2010-2011, y la beca de la Facultad a la 15ª Promoción de Licenciados en Ciencias Biológicas. En el mismo acto pudimos disfrutar de la conferencia "Un nuevo comienzo. Por fin, los pueblos dueños de sus destinos" a cargo del Dr. Federico Mayor Zaragoza, ex-Director General de la UNESCO y Presidente de la Fundación para una Cultura de Paz. Por último, también se anunció la concesión del premio "Vitatene awards for academic excellence 2011" por parte de la empresa VITATENE al estudiante con mejor expediente de la Licenciatura en Biotecnología.

Congresos, reuniones y otras actividades

La Asociación de Biólogos (BIOMA) organizó, con la colaboración y patrocinio de la FCCBA, la Clínica San Francisco y el Colegio Oficial de Biólogos de Castilla y León (COBCYL), las primeras Jornadas de Biología Forense, que se desarrollaron en el Aula Magna de la FCCBA entre los días 21 y 23 de febrero de 2012. Su objetivo fue, entre otros, dar a conocer las aplicaciones de



diferentes disciplinas de la Biología, como la Antropología, la Entomología, la Genética y la Palinología, a la investigación forense y la resolución de casos. También hubo charlas sobre Medicina Forense y Derecho Penal relacionado, así como sobre la organización de la Policía Científica, todas ellas impartidas por profesionales de cada área. Los estudiantes participantes en estas Jornadas, que fueron muy numerosos, tuvieron opción a realizar alguno de los 3 talleres propuestos en el programa.

La FCCBA desarrolló por segundo año sus jornadas “Y después ¿qué?”, organizadas en colaboración con la Asociación de Biotecnólogos de León (ABLE) y la Fundación General de la Universidad de León y de la empresa (FGULEM). Se llevaron a cabo dos tipos de actividades: el taller monográfico “Técnicas de búsqueda de empleo” realizado el 23 de marzo, y las “II Jornadas de orientación profesional” celebradas los días 30 de marzo y 17 de abril. El objetivo fue incrementar la empleabilidad de nuestros estudiantes dándoles a conocer las diferentes salidas profesionales, proporcionándoles herramientas que aumenten sus habilidades en la búsqueda de empleo y fomentando su capacidad emprendedora. En las acciones participaron profesionales de recursos humanos y de organización y dirección de empresas, representantes de empresas de los sectores biotecnológico y medioambiental y egresados de la Facultad incorporados al mundo laboral.

Al igual que en años anteriores, la Universidad de León celebró el 18 de abril de 2012 la Jornada de Puertas Abiertas, orientada a mostrar a los estudiantes de enseñanza secundaria la oferta de títulos y los recursos personales y estructurales de que dispone para su futura formación. Nuestra Facultad participó en la Jornada a través de una conferencia a cargo de la Decana, la Dra. Blanca Razquin Peralta, sobre los títulos de Grado en Biología, Biotecnología y Ciencias Ambientales, de visitas guiadas a las instalaciones (laboratorios y aulas) de los edificios Central y Darwin, y de la organización por parte de la delegación de estudiantes de mesas informativas.

La FCCBA participó en la celebración del primer Día Internacional de la Fascinación por las Plantas el pasado 18 de mayo de 2012. El evento fue promovido por la European Plant Science Organization (EPSO) con el objetivo de sembrar en la mente colectiva de los ciudadanos la idea de que las plantas tienen una importancia crítica para la sociedad, el medio ambiente y la economía, tanto en nuestros días como en el futuro. La coordinación a nivel nacional fue llevada a cabo por el Dr. José Pío Beltrán, profesor de investigación del CSIC y miembro del comité de dirección de la EPSO. En la celebración de

este día participaron más de 580 instituciones de 39 países, 34 de ellas españolas. La FCCBA de la Universidad de León lo hizo a través de una bella exposición, 3 talleres interactivos, visitas botánicas al campus y una conferencia a cargo de los profesores Drs. Marta Eva García González y Antonio Encina García. El público en general, y nuestros estudiantes en particular, asistieron a las diversas actividades y pudieron hablar con los profesores y científicos de las plantas sobre los avances en investigación aplicada y biología de las plantas.



Foto: Exposición "Pinceladas florales", con motivo de la celebración del "Día Internacional de la Fascinación por las plantas". Fotografía de J. García del Canto.

Entre los días 31 de mayo y 2 de junio se desarrollaron en el Aula Magna de la FCCBA las Jornadas de Biología Marina organizadas por BIOMA con la colaboración de la FCCBA, la CZULE, el COBCYL y la Librería Universitaria. Los estudiantes inscritos pudieron asistir a una serie de conferencias sobre fauna y ecosistemas marinos y litorales, acuicultura y explotación de otros recursos que ofrecen el mar y sus costas para el hombre (moléculas bioactivas, recursos energéticos, etc.). Las conferencias corrieron a cargo de doctores, ingenieros y profesores de nuestra Universidad, otras Universidades y otras entidades. Cabe destacar la participación y colaboración en la organización del Dr. Antonio Laborda Navia.

Si tienes alguna sugerencia o quieres enviarnos tus artículos, tu proyecto de tesis o alguna fotografía para la portada, ponte en contacto con nosotros:

ambiociencias@unileon.es

La edición electrónica de la revista se puede consultar en:

<http://biologia.unileon.es/descargas.htm>



En contraportada: Instantánea tomada durante la visita botánica al Campus, celebrada en el I Día de Fascinación por las Plantas.



Foto: J. García del Canto

★ 1968 ★



★ 2012 ★