

Premio Nobel de Medicina 2002: Brenner, Horvitz, Sulston y el gusano *Caenorhabditis elegans*

El Premio Nobel de Fisiología y Medicina otorgado en el 2002 tiene como importante actor un diminuto gusano. El Nobel fue entregado conjuntamente a Sydney Brenner, John Sulston y Bob Horvitz por sus estudios sobre el desarrollo y la muerte celular programada en el nematode *Caenorhabditis elegans*. Es interesante conocer cómo se desarrolló este sistema experimental que en la actualidad es un modelo que se utiliza para investigar moléculas de relevancia médica.

Todo comenzó en la década del 60, cuando Brenner cambió el enfoque de sus estudios anteriores. Para entonces, había contribuido nada menos que a descifrar el código genético y a descubrir el ARN mensajero. Decidió que, más que estudiar la función de las moléculas *per se*, había llegado el momento de empezar a investigar cómo los genes especifican un organismo.

En particular, a Brenner le intrigaba estudiar cómo se construye y se conecta el sistema nervioso. Para explorar estos temas con las herramientas de la genética que había adquirido en sus estudios sobre bacterias, debió encontrar un organismo de la complejidad necesaria pero suficientemente simple y fácil de manejar en un laboratorio. Luego de analizar muestras de especies provenientes de distintas partes del mundo, eligió un gusano microscópico, el nematode *C. elegans*. El adulto tiene sólo un milímetro de largo y 959 células somáticas. Existen gusanos machos y hermafroditas, tienen un ciclo de vida de 3 días, y son fáciles de mutagenizar, características ideales para estudios genéticos. Además, es transparente, por lo que puede examinarse la historia de cada una de sus células en el animal vivo.

Primero Sulston (1969) y luego Horvitz (1974) se unieron al laboratorio de Brenner en Cambridge, Inglaterra, para desarrollar el naciente modelo experimental del gusano. Sulston comenzó, luego ayudado por Horvitz, la laboriosa tarea de seguir cada una de las células durante el desarrollo post-embriionario, y así construyeron un mapa describiendo cuándo ocurre cada división celular y además cómo migran las células desde su lugar de nacimiento a su lugar definitivo en el animal adulto¹. Más tarde, Sulston logró seguir todas las células durante la etapa embrionaria², completando el único mapa para un animal multicelular que describe el destino de cada una de sus células. Estos estudios revelaron que el programa de división celular y diferenciación es esencialmente idéntico para cada gusano. Durante el desarrollo, se generan 1090 células, de las cuales 131 mueren en forma programada.

La muerte invariable de las células durante el desarrollo del gusano, llevó a Horvitz a pensar que la muerte celular era una decisión más que puede tomar una célula. Así como una célula puede tomar la decisión de transformarse en una neurona o en una célula muscular, también puede adoptar la decisión de morirse. Esto ocurre porque algunas células se necesitan sólo durante ciertos períodos del desarrollo y luego son prescindibles. También, por ejemplo, durante el desarrollo del cerebro de los mamíferos, miles de neuronas que no logran conectarse correctamente, mueren programadamente. Horvitz razonó que así como hay genes que controlan la diferenciación, deberían existir genes que controlan la muerte celular programada, proceso conocido en mamíferos como apoptosis. Usando genética clásica identificó y caracterizó las mutaciones que afectan el patrón y el proceso de la muerte celular^{3,4}. Horvitz y sus estudiantes analizaron estos genes en detalle, utilizando genética, bioquímica, biología molecular

y biología del desarrollo⁵. A partir de este trabajo, se confirmó que muchos de los genes y mecanismos que funcionan en la muerte celular programada en *C. elegans* también funcionan en mamíferos, incluyendo el hombre^{6,7}. De esta forma, los resultados del estudio de gusanos microscópicos están siendo utilizados para entender procesos complejos, como por ejemplo el cáncer y enfermedades neurodegenerativas que pueden ser, respectivamente, el resultado de la falta o del exceso de muerte celular programada.

El proceso de la muerte celular programada en *C. elegans*

El proceso de muerte celular programada en *C. elegans* comprende los siguientes tres pasos: la decisión de una célula a morirse, el proceso de la muerte, y la remoción y degradación de la célula.

Decisión de muerte

Dos genes, *ces-1* y *ces-2* (*ces*, *cell death specification* o especificación de la muerte celular), parecen regular la muerte en algunas células⁸. Específicamente en células que luego de la última división generan una neurona serotonérgica y una célula que muere. Mutaciones en *ces-1* y *ces-2* resultan en la supervivencia de estas células. Mediante el análisis genético se dedujo que *ces-1* previene la muerte de estas células y que *ces-2* bloquea la acción de *ces-1*. *Ces-2* codifica un factor de transcripción de la familia PAR (*proline and acid-rich* o que contiene prolina y es rica en aminoácidos ácidos) similar a la proto-oncoproteína humana HLF (*hepatic leukemia factor*, o factor de leucemia hepático). Versiones oncogénicas de HLF inhiben la muerte celular en células de mamíferos, sugiriendo que ciertas alteraciones en el programa de muerte celular pueden resultar en cáncer. Parecería entonces que distintos genes determinan la muerte en distintas células.

Proceso de muerte

Los productos de otros cuatro genes participan en el proceso de la muerte en todas las células. Estos genes sólo actúan en las células que van a morirse y no en las vecinas, por lo que tal vez sería más apropiado llamarlo suicidio celular. *Egl-1* (*egl*, *egg-laying abnormal* o puesta de huevos anormal), *ced-3* y *ced-4* (*ced*, *cell death abnormal* o muerte celular anormal) promueven la muerte celular, mientras que *ced-9* protege a la célula de la muerte^{4, 9, 10}.

Mutaciones que causan una pérdida total de la actividad de las proteínas codificadas por *egl-1*, *ced-3* y *ced-4*, los genes asesinos, tienen como consecuencia la supervivencia de las 131 células que normalmente mueren programadamente en *C. elegans*. El producto de *egl-1* es una proteína de sólo 91 aminoácidos que contiene una región similar a una porción de la proteína CED-9 mediante la cual interactúan para formar dímeros.

Cuando el gen *ced-3* fue clonado, no había en las bases de datos ninguna proteína de secuencia similar, hasta que una compañía farmacéutica, interesada en el proceso de inflamación, encontró una proteasa humana capaz de procesar la interleuquina-1 beta (llamada ICE) a su forma activa. Luego se demostró que CED-3 también es una proteasa que actúa de manera similar a ICE. A raíz de este descubrimiento, se encontró una familia de proteasas similares en mamíferos, llamadas caspasas, que también están involucradas en el proceso de muerte celular programada.

La secuencia de *ced-4* tampoco reveló la existencia de proteínas similares en los mamíferos, hasta que Apaf-1 fue identificada en un sistema *in vitro* para estudiar apoptosis. Su rol en apoptosis fue confirmado a través de ratones deficientes en Apaf-1, los cuales mueren durante el desarrollo embrionario o en el período perinatal. Los ratones sufren una masiva hiperplasia neuronal y desarrollan masas celulares ectópicas. Apaf-1 es una proteína que activa las caspasas. De manera similar CED-4 promueve la proteólisis de CED-3 generando su forma activa.

CED-9 funciona de manera similar al producto del gen humano *Bcl-2* (*B cell lymphoma* o linfoma de células B). Mutaciones en *Bcl-2* que causan elevados niveles de actividad resultan en la supervivencia y proliferación descontrolada de células B que conducen a la formación de un linfoma. Paralelamente, mutaciones que resultan en una excesiva actividad de *ced-9* causan la supervivencia de células que normalmente mueren. Además, mutaciones que reducen el nivel de actividad de *ced-9* resultan en la muerte de células que normalmente no mueren. Estas observaciones sugieren que la función normal de *ced-9* es proteger a las células que no deben morir.

Para establecer el orden de acción de estos genes se utilizaron varios métodos. La muerte excesiva de células que ocurre al inactivar *ced-9*, sigue ocurriendo en una doble mutante con *egl-1*, pero no ocurre en una doble mutante con *ced-3* o *ced-4*, por lo que se puede proponer un modelo en que *egl-1* previene la acción de *ced-9*, que a su vez previene la acción de *ced-3* y *ced-4*. *ced-4* parece actuar antes de *ced-3* puesto que cantidades elevadas de la proteína CED-3 causan la muerte de células sin importar la presencia de CED-4, mientras que la muerte de células en gusanos con cantidades elevadas de CED-4 requiere la presencia de CED-3. Además, las proteínas EGL-1 y CED-9 pueden formar un complejo, al igual que CED-9 y CED-4.

Remoción y degradación

Las células que mueren son removidas del organismo por células que las fagocitan. En *C. elegans*, por lo menos 7 genes, que tienen su contraparte en mamíferos, controlan este proceso. Los 7 genes pueden agruparse en dos clases parcialmente redundantes, una compuesta por *ced-1*, *ced-6* y *ced-7* y la otra por *ced-2*, *ced-5*, *ced-10* y *ced-12*^{3,11}. Estos genes participan en dos rutas de transducción de señales, una de las cuales controla las extensiones que la célula fagocítica usa para envolver a la célula que está muriendo.

Estudios recientes en el laboratorio de Horvitz y otros, demostraron que el proceso de remoción no es simplemente la etapa final de la muerte celular programada, ya que en esta etapa las células todavía están a tiempo de evitar la muerte. Es decir, la célula fagocítica cumple un rol activo al aumentar las probabilidades de que el proceso de muerte celular sea irreversible.

La similitud en secuencia y modo de acción entre algunos de los genes que actúan en la muerte celular programada en *C. elegans* y los genes involucrados en algunos tipos de cáncer en el hombre, relacionan estos dos procesos estrechamente. Es cuestión de tiempo que los conocimientos adquiridos se traduzcan en tratamientos anticáncer.

El premio Nobel de Medicina de este año trasciende la serie de experimentos que delinearon un proceso celular, y premia la visión transformadora de Brenner, la perseverancia de Sulston y la disciplina e ingenio de Horvitz para caracterizar un modelo experimental que en la actualidad es utilizado por miles de científicos para investigar áreas tan diversas como el desarrollo embrionario, la neurobiología y la biología del comportamiento.

Ezequiel Alvarez Saavedra

Department of Biology

Massachusetts Institute of Technology

Boston MA, USA

eas@mit.edu

1. Conradt B, Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 1998; 93: 519-29.
2. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 1986;44: 817-29.
3. Ellis RE, Horvitz HR. Two *Caenorhabditis elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* 1991;112: 591-603.
4. Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1991; 129: 79-94.

5. Hedgecock EM, Sulston JE, Thomson JN. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1983; 220: 1277-9.
6. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; 356: 494-9.
7. Hengartner MO, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 1994; 76: 665-76.
8. Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*: past, present and future. *Trends Genet* 1998; 14: 410-6.
9. Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1977; 56: 110-56.
10. Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1983; 100: 64-119.
11. Vaux DL, Weissman IL, Kim SK. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992; 258: 1955-7.

- - -

A close relation exists also between liberty and democracy. One of the finest definitions of democracy was given by a scientific investigator, Pasteur, when he said that it is "the form of government in which everyone is free to do his best for the public welfare".

Existe una estrecha relación entre libertad y democracia. Una de las más acertadas definiciones de democracia fue hecha por un investigador científico, Pasteur, cuando dijo que ella es "la forma de gobierno en que cada uno es libre de hacer lo mejor que pueda para el bienestar público".

Walter B. Cannon (1871-1945)

The way of an investigator