



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Mecanismos moleculares implicados en la regulación
de la muerte celular y patologías asociadas a
alteraciones en dicha regulación**

Autores: Irene Alameda García. Carlos Camacho Macorra.

Tutor: Almudena Porras Gallo

Convocatoria: Febrero

Contenido

Resumen	3
Objetivos	3
Palabras clave	3
Introducción y antecedentes.....	3
1. Apoptosis.....	5
1.1. Caspasas	5
1.2. Proteínas de la familia de Bcl-2.....	6
2. Apoptosis: Vía intrínseca caspasa-dependiente y caspasa independiente	7
3. Apoptosis: Vía extrínseca	8
Material y métodos.....	9
Resultados y discusión	10
1. Proteínas de la familia de Bcl-2 y enfermedad	10
2. Mcl-1	11
2.1. Mcl-1 y enfermedad.....	13
3. Mcl-1 como diana terapéutica.....	15
3.1. Fármacos que disminuyen los niveles de Mcl-1	16
3.2. Tratamiento con oligonucleótidos antisentido (ASO)	17
3.3. BH3-miméticos	17
Conclusiones	18
Bibliografía	18

Resumen

La muerte celular es un proceso que está estrechamente relacionado no sólo con el desarrollo fisiológico normal de los tejidos, sino también, con mecanismos de defensa frente a varios tipos de enfermedades humanas. Este trabajo se centra principalmente en la apoptosis, un tipo de muerte celular programada que participa en el desarrollo y la homeostasis de los organismos que forman parte del reino animal. Se explicarán los mecanismos que intervienen en su regulación, además de las distintas moléculas responsables de la misma, como las caspasas, responsables del desmantelamiento a nivel celular y las proteínas de la familia de Bcl-2, de cuyo equilibrio depende el destino de la célula. Un miembro destacado de la familia de proteínas de Bcl-2 es Mcl-1, una proteína antiapoptótica clave en la regulación de la apoptosis. Analizaremos cómo la alteración de su expresión se ha visto implicada en distintas patologías haciendo de Mcl-1 una prometedora diana terapéutica para el desarrollo de futuros tratamientos farmacológicos.

Objetivos

El principal objetivo de este trabajo ha sido entender los mecanismos implicados en la regulación de la apoptosis con el fin de mostrar su magnitud y su relevancia en el mantenimiento de la homeostasis de la célula. De forma paralela, este trabajo reúne las evidencias que demuestran la participación de la apoptosis en distintas patologías, incidiendo especialmente en la proteína Mcl-1 como protagonista.

Palabras clave: apoptosis, proteínas Bcl-2, Mcl-1, enfermedad.

Introducción y Antecedentes

Según la definición del Comité de Nomenclatura Sobre Muerte Celular, NCCD, (*Nomenclature Committee on Cell Death*) una célula se considera muerta cuando se dan uno o varios de los siguientes criterios moleculares o morfológicos:

1. la célula ha perdido la integridad de su membrana plasmática,
2. la célula, incluyendo su núcleo, ha sufrido fragmentación completa, mostrando los denominados cuerpos apoptóticos y/o,
3. los fragmentos de la célula han sido fagocitados por las células adyacentes.¹

Durante años, la muerte celular ha sido clasificada en función de criterios morfológicos, sin embargo, son posibles varias clasificaciones atendiendo a criterios enzimológicos, aspectos funcionales o características inmunológicas². Por ello, y debido a la discrepancia existente en la

bibliografía, el NCCD publicó en 2011 una clasificación funcional y bioquímica de los tipos de muerte celular con el fin de unificar criterios (Tabla 1).

Nomenclatura	Hallazgos bioquímicos	Dependencia de caspasas	Inhibidores
Anoikis	Disminución de EGFR. Inhibición de ERK1. Ausencia de β 1-integrina. Sobreexpresión de Bim. Activación de caspasa-3 (-6,-7).	++	Sobreexpresión de Bcl-2. Administración de Z-VAD-fmk.
Muerte celular asociada a autofagia	Lipidación de MAP1LC3. Degradación de SQSTM1/p62.	--	Inhibidores de VPS34. Silenciamiento génico de AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12 o BCN1.
Apoptosis intrínseca dependiente de caspasas	MOMP. Disipación irreversible del $\Delta\psi_m$.	++	Sobreexpresión de Bcl-2. Administración de Z-VAD-fmk.
Apoptosis intrínseca independiente de caspasas	Liberación de proteínas IMS. Inhibición de la cadena respiratoria.	--	Sobreexpresión de Bcl-2
Cornificación	Activación de la transglutaminasa. Activación de la caspasa-14.	+	Silenciamiento génico de la caspasa-14. Silenciamiento génico de TG1, TG3 o TG5.
Entosis	Activación de RHO. Activación de ROCK1.	--	Silenciamiento génico de la metalotionina. Inhibidores lisosomales.
Apoptosis extrínseca por receptores de muerte	Señalización de receptores de muerte. Activación de caspasa-8 (-10). Proteólisis de Bid y MOMP (en células tipo II). Activación de caspasa-3 (-6,-7).	++	Silenciamiento génico de la caspasa-9 y -3. Silenciamiento génico de PP2A. Administración de Z-VAD-fmk.
Apoptosis extrínseca por receptores de dependencia	Señalización por receptores de dependencia. Activador de PP2A. Activación de DAPK1. Activación de caspasa-3 (-6,-7).	++	Silenciamiento génico de la caspasa-9 y -3. Silenciamiento génico de PP2A. Administración de Z-VAD-fmk.
Catástrofe mitótica	Activación de la caspasa-2. Activación de TP53 y TP73. Arresto mitótico.	--	Inhibición farmacológica o genética de la caspasa-2. Silenciamiento de TP53.
Necroptosis	Señalización por receptores de muerte. Activación de RIP1 y/o RIP3. Inhibición de caspasas.	--	Administración de necrostatinas. Silenciamiento génico de RIP1 y/o RIP3.
Netosis	Inhibición de caspasas. Liberación de NET. Activación de NADPH oxidasa.	--	Inhibición de autofagia. Silenciamiento génico de PAD4. Inhibición de la NADPH oxidasa.
Partanatos	Disipación irreversible del $\Delta\psi_m$. Acumulación de PAR mediada por PARP1. Depleción de NADH y ATP. Traslocación nuclear de AIF y unión de AIF a PAR.	--	Inhibición farmacológica o génica de AIF. Inhibición de PARP1.
Piroptosis	Activación de caspasa-1 y -8. Secreción de interleukina-1 β e interleukina-18.	++	Administración de Z-YVAD-fmk. Silenciamiento génico de caspasa-1.

Tabla 1. Clasificación funcional basada en características bioquímicas de los tipos de muerte celular².

Abreviaturas: AIF, *apoptosis inducing factor*; AMBRA 1, *autophagy/beclin-1 regulator 1*; ATG, *autophagia*; BCN1, *beclina 1*; $\Delta\psi_m$, potencial de la membrana mitocondrial; DAPK1, *death-associated protein kinase 1*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; ERK1, *extracelular-regulated kinase 1*; IMS, espacio intermembrana; MAP1LC3, *microtubule-associated protein 1 light chain 3*; MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*; NET, *neutrophil extracellular trap*; PAD4, *peptidylarginine deiminase 4*; PAR,

poly(ADP-ribose); PARP1, poly(ADP-ribose) polymerase 1; PP2A, protein phosphatase 2A; RIP, ribosome inactivating protein; ROCK1, RHO-associated coiled-coil containing protein kinase 1; SQSTM1, secuestrosoma 1; TG, transglutaminasa; TP, tumor protein; VPS34, vacuolar protein sorting; Z-VAD-fmk, N-benzyloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone; Z-YVAD-fmk, N-benzyloxycarbonyl-Tyr-Val-Ala-Asp-DL-Asp-Fluoromethylketone;

No obstante, aunque los parámetros bioquímicos presentan grandes ventajas sobre los morfológicos, es importante aclarar que un único parámetro no puede usarse como indicador absoluto de una modalidad de muerte celular, ya que en ocasiones un mismo proceso molecular puede ser compartido por más de un tipo de muerte. ²

En este trabajo analizaremos con detenimiento la apoptosis, una de las modalidades de muerte celular más estudiadas hasta el momento, con el fin de profundizar en su regulación y en las consecuencias derivadas de una alteración en la misma.

1. Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que participa en el desarrollo y la homeostasis de los organismos que forman parte del reino animal. Se caracteriza por la contracción de las células, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la formación de burbujas en la membrana y finalmente la separación de los componentes celulares en el interior de los cuerpos apoptóticos, debido a la actividad proteolítica de las caspasas.

1.1. Caspasas

Las caspasas (cisteín-aspartato-proteasas) son una familia altamente específica de proteasas, que fragmentan sus sustratos tras una secuencia peptídica (P4-P3-P2-P1) donde P1 es un residuo de aspartato. Las caspasas que participan en la apoptosis pueden ser divididas en dos categorías: caspasas iniciadoras y caspasas ejecutoras. Las caspasas iniciadoras o del grupo II (caspasa-2, caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-10) inician la cascada de señalización en apoptosis y su activación es necesaria para la activación de las caspasas ejecutoras o del grupo III (caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-9). Las caspasas del grupo I son aquellas que participan en procesos de inflamación.

Los sustratos de las caspasas iniciadoras son muy limitados, incluyéndose a sí mismas, a las caspasas ejecutoras y a BID, una proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia de BCL-2. Por el contrario, se conocen cientos de sustratos de las caspasas ejecutoras.

Todas las caspasas cuentan con tres dominios: un prodominio y dos subunidades donde reside su actividad catalítica (una mayor de aproximadamente 20kDa y una menor de 10kDa). Las caspasas iniciadoras poseen además motivos reguladores en su prodominio, como el dominio DED (*death*

effector domain), presente en las procaspasas -8, y -10, y el dominio CARD (*caspase activation recruitment domain*), presente en las procaspasas-2 y -9.

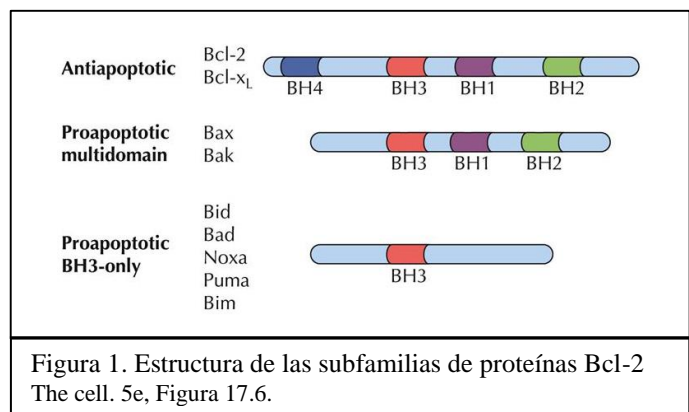
Las caspasas iniciadoras circulan inactivas en forma de monómeros y para su activación es necesaria su dimerización previa. En el caso de la caspasa-8, los dímeros se forman debido al reclutamiento de estos a través de la unión de sus prodominios al adaptador FADD (*FAS-associated death domain protein*). Finalmente, se produce la escisión entre dominios para la estabilización de la caspasa-8 activada. En contraste, las caspasas ejecutoras circulan inactivas en forma de dímeros y tan solo es necesaria la escisión por parte de una caspasa iniciadora ya activa para su activación ^{3, 4, 5}.

1.2 Proteínas de la familia de Bcl-2

Además de las caspasas, existe otra gran familia de proteínas protagonistas en el proceso de apoptosis. Se trata de las proteínas de la familia Bcl-2, clave en la vía intrínseca de activación de la apoptosis. Todos sus miembros contienen de uno a cuatro dominios de homología con la proteína Bcl-2 que se denominan BH1, BH2, BH3 y BH4 y se pueden subdividir en dos grandes grupos según tengan una función proapoptótica o antiapoptótica.⁶ (Figura 1)

Aquellas con actividad antiapoptótica (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl2A1, Bcl-B) ejercen su función por unión directa a las proteínas proapoptóticas. Poseen en su mayoría los cuatro dominios BH, formando los tres primeros una cavidad hidrofóbica que permite su interacción con proteínas que sólo tienen el dominio BH3 mientras que su extremo C-terminal facilita su inserción en la membrana mitocondrial externa.

Las que poseen actividad proapoptótica se dividen a su vez en proteínas multidominio o efectoras (Bax, Bak, Bok) y las proteínas con un dominio BH3 (Bik, HRK, Bim, Bad, Bid, PUMA, NOXA, BMF). La activación de estas proteínas conducen a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP), y además, promueven la fragmentación de este orgánulo.⁷ El ejemplo más importante es el de las proteínas Bax y Bak, que en condiciones normales se encuentran como monómeros inactivos, pero, tras su activación, sufren cambios conformacionales que les permiten oligomerizar y formar el poro mitocondrial desencadenando eventos claves en el proceso de apoptosis.⁸



La activación de Bax/Bak va a depender de su interacción con proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, proteínas proapoptóticas con un dominio BH3 o entre las propias Bax y Bak, existiendo distintos modelos para explicar su mecanismo de acción:

- El modelo directo se basa en que las proteínas con un dominio BH3, Bid y Bim, son capaces de inducir la activación de Bax/Bak⁹, mientras que el resto de miembros de su grupo actúan desplazando a las activadoras de su unión con las antiapoptóticas evitando así la inhibición de Bax y Bak.
- El modelo indirecto propone que las proteínas con un dominio BH3 actúan desplazando la interacción de las antiapoptóticas¹⁰ con Bax/Bak permitiendo así que la actividad basal de estas dos permita el comienzo del proceso.
- El modelo mixto entiende a la membrana externa mitocondrial como una estructura con un papel activo en el proceso. En este caso, las proteínas antiapoptóticas citoplasmáticas son reclutadas a la membrana desde el citoplasma y allí inhiben tanto a las proteínas con un dominio BH3 como Bax y Bak, evitando la apoptosis. Para invertir esta situación las proteínas con un dominio BH3 con papel sensibilizador desplazan estas interacciones permitiendo que Bax sea reclutada desde el citosol y que ambas proteínas se activen y oligomericen.

En lo que coinciden los tres modelos es en el hecho de que la especificidad se consigue por las diferencias en la afinidad de las proteínas con un dominio BH3 por las proteínas antiapoptóticas.

Dada la importancia del proceso en el que participan estas moléculas, la regulación de su activación es muy fina y actúa en distintos niveles. Su expresión puede ser inducida por factores como son los niveles de la proteína pro-apoptótica p53 o el daño en el DNA^{11, 12}, mientras que a nivel post-traduccional algunas se activan por desfosforilación, como es el caso de Bad¹³ o por proteólisis por caspasas como en el caso de Bid^{14,15}.

2. Apoptosis: Vía intrínseca caspasa-dependiente y caspasa independiente

La muerte celular por apoptosis puede ser desencadenada por distintas condiciones que dan lugar a estrés intracelular, incluyendo daño en el ADN, estrés oxidativo, sobrecarga de Ca²⁺ en el citosol, excitotoxicidad y acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático, entre otras.

Aunque existe una gran variedad de estímulos, todos ellos convergen en la mitocondria como centro de control. En las membranas mitocondriales se concentran tanto señales proapoptóticas como señales antiapoptóticas, de forma que si son las primeras las que predominan, se produce la permeabilización.

La permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP), tiene lugar como consecuencia del poro formado por los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bak. Es entonces cuando el potencial de la membrana ($\Delta\Psi_m$) mitocondrial se disipa, se paraliza la síntesis de ATP y se liberan proteínas del espacio intermembrana al citosol, como el Citocromo c (CYTC), AIF (*apoptosis inducing factor*), la endonucleasa G (ENDOG), DIABLO/SMAC (*direct IAP-binding protein with low pI / second mitochondria-derived activator of caspases*) y HTRA2 (*high temperatura requirement protein A2*) (Figura 2). Además, la cadena respiratoria es inhibida, provocando la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que dan lugar a un circuito de retroalimentación de señales proapoptóticas. La apoptosis intrínseca provoca una catástrofe bioenergética y metabólica resultante de múltiples mecanismos.

De forma paralela, el Citocromo c participa junto con APAF1 (*apoptosis protease-activating factor-1*) y dATP en la formación del apoptosoma, lo que provoca la activación de la caspasa-9, que a su vez, activa a la caspasa-3 a través de una cascada proteolítica. AIF y ENDOG se translocan al núcleo, donde median la fragmentación del ADN de forma independiente de las caspasas, y SMAC/DIABLO y HTRA2 inhiben la función antiapoptótica de distintos miembros de la familia de las IAP (*inhibitors of Apoptosis*) contrarrestando la inhibición de las caspasas. Además, HTRA2 ejerce un efecto proteolítico independiente de caspasas debido a su actividad serín-proteasa².

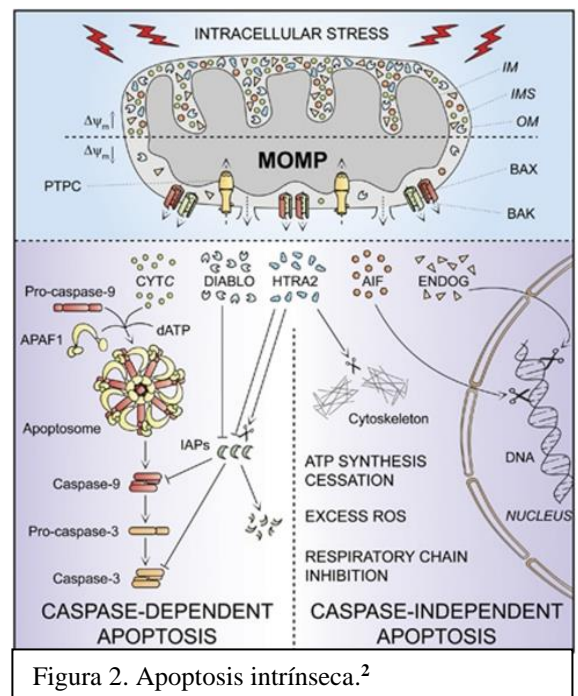


Figura 2. Apoptosis intrínseca.²

3. Apoptosis: Vía extrínseca

El término apoptosis extrínseca ha sido ampliamente usado para definir la muerte celular apoptótica inducida por señales de estrés extracelular que son detectadas y propagadas por receptores transmembrana específicos. Esta vía es iniciada por la unión de un ligando de muerte, como el ligando de Fas (FASL/CD95L), TNF α (*tumor necrosis factor alpha*) o TRAIL/Apo2L (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) a distintos receptores.

De forma alternativa, la vía extrínseca es activada además por receptores de dependencia, los cuales, sólo ejercen su función letal cuando la concentración de su ligando disminuye por debajo de ciertos límites críticos. Es entonces cuando inducen la activación de las caspasas, en particular de la

caspasa-3. Estos receptores, como Patched y DCC, en ausencia de su ligando, parecen interactuar con la proteína adaptadora citoplasmática DRAL que ensambla un complejo que activa a las caspasa 9. Otro receptor de dependencia como UNC5B, responde a la falta de netrina-1 con el reclutamiento de un complejo de señalización que incluye a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y a la proteína quinasa-1 asociada a muerte (DAPK-1). Estas interacciones multiproteicas conducirían a la desfosforilación de DAPK lo cual dispara el potencial proapoptótico de esta proteína² (Figura 3).

La ruta de señalización prototipo que conduce a la apoptosis extrínseca es la protagonizada por el ligando de Fas (FAS L). En ausencia de este ligando, las subunidades del receptor FAS se ensamblan espontáneamente dando lugar a trímeros que se estabilizan después con la unión de su ligando. Dicha unión induce además cambios conformacionales en el receptor, que permiten el ensamblaje de un complejo multiprotéico dinámico en su parte citosólica a través del dominio de muerte (DD, death domain) del receptor.

Entre las proteínas reclutadas por el dominio de muerte se encuentran RIP1 (*Receptor-interacting protein 1*), FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) y la procaspasa-8, entre otras. El complejo supramolecular formado se denomina DISC (*death-inducing signaling complex*) y constituye la plataforma que regula la activación de las caspasas-8 y -10. En las células de tipo I, como son los linfocitos, la activación de las caspasas-8 y -10 es suficiente para activar a las caspasas ejecutoras. Sin embargo, en las células de tipo II, como son los hepatocitos y las células β del páncreas, es necesaria la participación de las mitocondrias para inducir apoptosis. Las caspasas iniciadoras activan a la proteína de la familia de BCL-2, BID, mediante proteólisis permitiendo que la proteína troncada tBID active a BAX/BAK, dando lugar a la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP) que conecta la vía intrínseca con la extrínseca.²

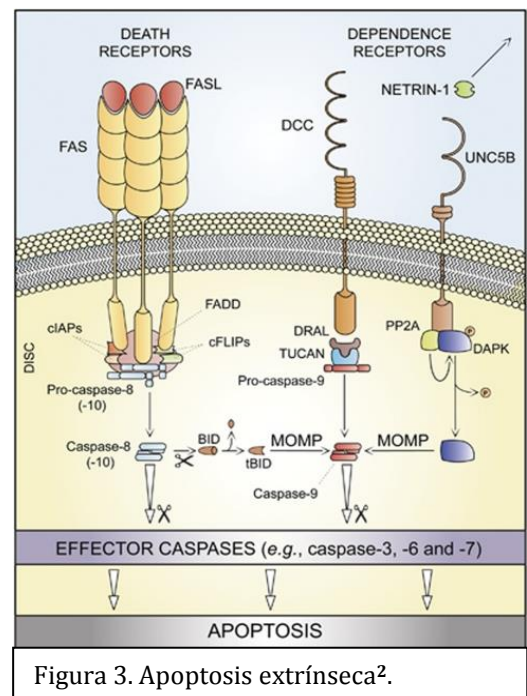


Figura 3. Apoptosis extrínseca².

Material y métodos

En este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica utilizando con principal motor de búsqueda PubMed, el cual permite el libre acceso a la base de datos de Medline que contiene citas y

artículos de investigación biomédica. La búsqueda de artículos se ha llevado a cabo por lenguaje libre, analizando además las referencias bibliográficas de artículos ya seleccionados con el fin de rescatar otros estudios potencialmente relevantes para su inclusión. Se han aceptado los artículos considerados más destacados según criterios científicos sin importar el año de publicación, utilizando como idioma el inglés por ser la lengua vehicular en el campo médico. Finalmente se obtuvieron treinta y un artículos de referencia y se consultó además un manual de patología general con el fin de fijar conocimientos básicos.

Resultados y discusión

La apoptosis es un mecanismo esencial para entender múltiples fenómenos biológicos fundamentales como la embriogénesis, el recambio celular en tejidos formados por células intermitóticas (células hematopoyéticas, cutáneas o células de la mucosa digestiva), la atrofia mamaria tras la lactancia o la atrofia prostática. La apoptosis desempeña un papel fundamental en la respuesta inmunológica e inflamatoria, sin embargo, está también implicada en procesos patológicos, ya sea por exceso o por defecto.¹⁶ De forma clásica, las enfermedades en las que la apoptosis participa pueden dividirse en dos grupos: aquellas en las que hay un incremento de la supervivencia celular (enfermedades asociadas a una inhibición de la apoptosis), y aquellas en las que tiene lugar un incremento de la muerte celular (apoptosis hiperactiva). Dentro del grupo de las enfermedades asociadas a una inhibición de la apoptosis se incluyen algunas neoplasias, enfermedades autoinmunes e infecciones víricas. Por el contrario, determinadas enfermedades neurodegenerativas, hematológicas, SIDA, así como enfermedades que cursan con isquemia, han sido relacionadas con un incremento de la apoptosis.¹⁷

1. Proteínas de la familia Bcl-2 y enfermedad

Las proteínas de la familia Bcl-2 son los principales reguladores del proceso de apoptosis e incluyen tanto miembros proapoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, NOXA y PUMA) como antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-W y A1). El equilibrio entre los niveles relativos de estas proteínas antagónicas es crítico para el destino de la célula, de forma que cualquier mecanismo que lo altere, puede dar lugar a las enfermedades anteriormente citadas.¹⁸

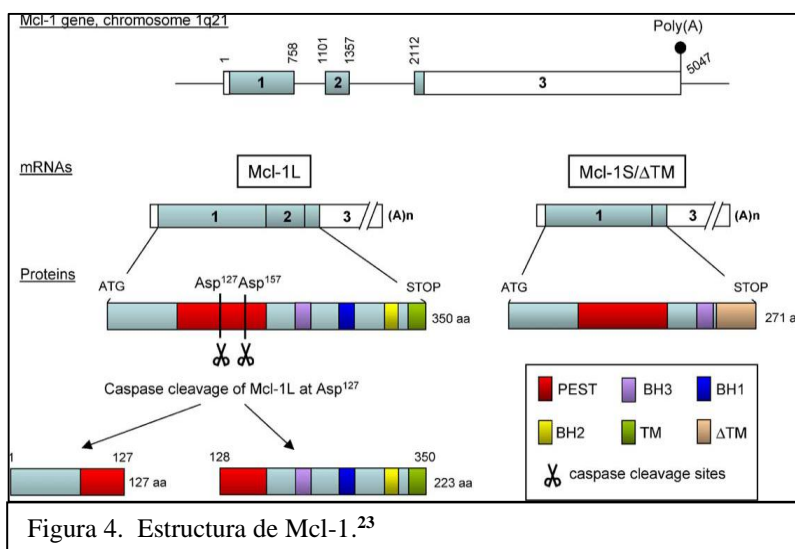
La expresión de los genes de las proteínas Bax, Bak y Bad se oponen a la carcinogénesis, mientras que la expresión de la proteína Bcl-2, puede promover el crecimiento celular cancerígeno mediante el bloqueo de la apoptosis. Se ha observado una sobreexpresión de Bcl-2, en varios tipos de cáncer, incluyendo mama, colon, tiroides y endometrio. Distintos estudios han demostrado además, que la expresión de Bcl-2 varía en función del grado de agresividad del tumor y de su diferenciación.¹⁹

Experimentos llevados a cabo con ratones deficientes (*knockout*) en Bim, han demostrado que Bim es fundamental para la supervivencia de linfocitos, granulocitos y neuronas ²⁰, y que la deficiencia de PUMA en cultivos de células mieloides, produce la resistencia de estas a los factores de crecimiento que condicionan su correcto desarrollo. Tanto Bim como PUMA median la muerte celular a través de la inhibición de los factores de crecimiento durante el desarrollo de las células T. ²¹ Otra de las proteínas clave para el destino de las células es Bcl-xL. Su déficit tiene como consecuencia la letalidad del embrión a los 13 días, debido a los fallos provocados en el desarrollo neural y en los eritrocitos. En relación a los megacariocitos, Bcl-xL desempeña las mismas funciones que Mcl-1 y por ello la pérdida de ambos, produce profundos efectos en este linaje. ²²

2. Mcl-1

Mcl-1 (*Myeloid cell leukaemia-1*) es una proteína antiapoptótica perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2 que fue identificada en 1993 en células mieloides en proceso de diferenciación. Mcl-1 se expresa además en múltiples linajes celulares y se trata de un miembro clave de la familia Bcl-2 para el control de la apoptosis. ²³ El gen Mcl-1 en humanos se localiza en el cromosoma 1q21 y contiene tres exones. El corte y empalme alternativo da lugar a dos RNAm de Mcl-1. Uno de ellos contiene los tres exones y el otro carece del exón 2 y codifican, respectivamente, a las isoformas Mcl-1_L y Mcl-1_S. Mcl-1_L contiene 350 residuos de aminoácidos, los dominios BH1, BH2 y BH3 y un dominio C-terminal transmembrana, mientras que Mcl-1_S contiene 271 aminoácidos y sólo un dominio BH3 ¹⁸ (Figura 4).

Ambas isoformas contienen dos dominios PEST en su extremo N-terminal ricos en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), una secuencia característica de las proteínas que poseen una vida media corta (se estima que mcl-1 tiene una vida media de 2-3h) ²⁴. El dominio transmembrana permite anclar Mcl-1_L a distintas membranas celulares, siendo la más destacada la membrana externa mitocondrial. Sorprendentemente, aunque Mcl-1_L y Mcl-1_S proceden del corte y empalme alternativo de un mismo gen, ambas desempeñan funciones opuestas ya que Mcl-1_L es una proteína antiapoptótica y Mcl-1_S proapoptótica. ¹⁸



Mcl-1 (Mcl-1_L será llamada así en adelante) se localiza principalmente en la membrana externa mitocondrial y promueve la supervivencia celular mediante la inhibición de la liberación del Citocromo c desde el interior de la mitocondria, a través de la heterodimerización y consecuente neutralización de Bak, un efector proapoptótico de la familia Bcl-2. Mcl-1 también interactúa selectivamente con las proteínas que sólo tienen el dominio BH3, Bim, ^lBim, Bik, PUMA y NOXA. Como mecanismo de acción más plausible para Mcl-1, se ha sugerido que ejerce su función antiapoptótica mediante el secuestro de Bak en la membrana externa de la mitocondria, impidiendo así su oligomerización en esta. Sin embargo, cuando se reciben señales proapoptóticas, Bik, NOXA, y ^lBid pueden desplazar a Bak del heterodímero Mcl-1-Bak, permitiendo la oligomerización de este y consecuentemente la salida de Citocromo c del interior de la mitocondria (modelo indirecto o de desplazamiento).

Un mecanismo alternativo propone la unión directa de las proteínas que sólo tienen el dominio BH3 (Bim, PUMA y ^lBid) a Bak o Bax para activarlas, siempre que estas no estén unidas a proteínas antiapoptóticas como Mcl-1. Debido a que Mcl-1 posee un dominio transmembrana, es razonable que actúe preferentemente mediante el secuestro de Bak en la membrana mitocondrial. ¹⁸

La transcripción de Mcl-1 está inducida por distintos factores de crecimiento, incluyendo citoquinas como IL-3, IL-5, IL-6, GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y factores de crecimiento como EGF (*epidermal growth factor*) y VEGF (*vascular endothelial growth factor*). La región promotora de Mcl-1 contiene sitios de unión de factores de transcripción como son los distintos miembros de la familia STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), CRE (cAMP response elements) y NF-κB (*Nuclear Factor Kappa B*). ²⁵ Mcl-1 contiene también múltiples sitios de fosforilación en su región PEST. La fosforilación es una forma casi universal, rápida y reversible modificación de las proteínas que produce una importante influencia en su comportamiento, localización, estructura, interacciones proteína-proteína, regulación de otras proteínas, función, y, como es el caso, en su estabilidad. La Thr¹⁶³ puede ser fosforilada por ERK (*Extracellular Signal-regulated Kinase-1*), lo que conlleva un incremento de la vida media de Mcl-1. Por el contrario, GSK-3 (*Glycogen synthase kinase 3*) media la fosforilación de la Ser¹⁵⁹ produciendo un incremento de la ubiquitinación y degradación de la proteína. La degradación de Mcl-1 está principalmente mediada por el proteasoma a través de distintos mecanismos, como el anteriormente citado, y el llevado a cabo por MULE (*Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3*) que ubiquitina a Mcl-1 en cinco residuos de lisina diferentes siendo este el principal mediador de su degradación. ²⁴ La región PEST

contiene además sitios de corte de caspasas (Asp¹²⁷ y Asp¹⁵⁷) que contribuyen a disminuir la expresión de Mcl-1. No obstante, se sabe que el fragmento C-terminal resultante del corte de Asp¹²⁷, especialmente por la caspasa 3, es un potente promotor de la muerte celular. ²³

2.1 Mcl-1 y enfermedad

Numerosos y diversos tipos de células han demostrado ser dependientes de Mcl-1 para su supervivencia y desarrollo. Por ejemplo, Mcl-1 es la única proteína de entre los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 esencial para el desarrollo embrionario. La delección del gen de Mcl-1 resulta letal durante la peri-implantación en ratones, ya que el embrión muere a los 3,5 días. ^{22, 25, 26}

Mcl-1 es indispensable para la supervivencia de las células madre hematopoyéticas. ²⁵ Las células madre hematopoyéticas dan lugar a los linajes mieloides y linfoides, y se encargan de mantener su población en equilibrio, a través del balance entre la autorrenovación y diferenciación propia. La apoptosis desempeña un papel clave en la regulación de este balance. Durante la hematopoyesis la proteína antiapoptótica Mcl-1 es fundamental, ya se trata de un factor de supervivencia necesario para todos los linajes celulares tempranos y células precursoras. Sin embargo, la causa de este requerimiento no se conoce por completo. ²²

Mcl-1 está relacionado con el desarrollo y mantenimiento de los linfocitos B y T. Un estudio del 2003 lo demuestra, ya que se pudo observar una importante disminución en el número de linfocitos B y T periféricos en aquellos ratones a los que se les eliminó Mcl-1. La delección de Mcl-1 durante estadios tempranos de diferenciación linfocítica incrementa la apoptosis y detiene el desarrollo de células pro-B y de células T doble negativas. Por lo tanto, Mcl-1 es necesaria para garantizar el desarrollo y el mantenimiento de la población de linfocitos B y T.

No obstante, los linfocitos no son las únicas células de la sangre en cuya regulación está implicada esta proteína. En los neutrófilos, la apoptosis tiene lugar de forma constitutiva, sin necesidad de estimulación externa, debido en parte a que se trata de células quiescentes. Carecen de quinasas dependientes de ciclinas (CDK), enzimas responsables del correcto desarrollo del ciclo celular, pero también carecen de otro de los miembros antiapoptóticos clave en la regulación de la muerte celular, Bcl-2. Por todo ello, los neutrófilos dependen de Mcl-1 para la prevención de la apoptosis. Se ha demostrado que la depleción de Mcl-1 es suficiente para inducir la muerte de las células de la línea U937. ²⁷

En los lugares de infección o de tejido dañado, la prolongación de la esperanza de vida de los neutrófilos es crítica para una defensa efectiva del hospedador. La apoptosis y el aclaramientos de los neutrófilos son puntos de control críticos para la resolución de la respuesta inflamatoria y Mcl-1

constituye una herramienta de respuesta rápida para ello. Enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn y la sepsis severa presentan un incremento significativo de la expresión de Mcl-1. ²⁸

Otras de las células que participan en la respuesta inflamatoria y que están reguladas por Mcl-1 son los macrófagos. El aumento de los niveles de la isoforma Mcl-1_S ha sido identificada durante los procesos infecciosos mediados por macrófagos y parece constituir un importante mecanismo que condiciona la resolución del proceso. Así mismo, se ha sugerido que Mcl-1 es absolutamente requerida para la supervivencia de estas células. ²⁵

También se ha visto que Mcl-1 desempeña un importante papel en el desarrollo de cánceres hematológicos. La desregulación de la expresión de Mcl-1 condiciona el proceso de formación de linfomas.²⁹ Así, la sobreexpresión incrementa la incidencia de linfomas de células B en ratones. ²⁵ Además se ha demostrado que en el linfoma cutáneo de células T, así como en el linfoma de las células del manto, una mayor expresión de Mcl-1 está relacionada con un alto grado de la enfermedad o bien con fases tardías de la misma, sugiriendo que la desregulación de la expresión de Mcl-1, puede ser un factor diagnóstico de la progresión del linfoma. ²⁹

La proteína Mcl-1 participa además en el desarrollo de mieloma múltiple y distintos tipos de leucemias. El mieloma múltiple se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas en la médula ósea, siendo Mcl-1 la principal proteína antiapoptótica que condiciona la supervivencia de estas células. Se sabe también que lo hace a través de la ruta JAK/STAT y que tan solo su sobreexpresión es suficiente para promover la proliferación de las células del mieloma independientemente de la IL-6, principal factor de supervivencia para las células plasmáticas. ²⁰ En relación a las leucemias, tanto en las crónicas como en las agudas, así como en las mieloides y linfoides, Mcl-1 ha demostrado ser extremadamente importante para la supervivencia de las células. ^{24, 25} En la leucemia linfocítica crónica, caracterizada por la acumulación de células B maduras y no proliferativas, altos niveles de expresión de Mcl-1 están ligados a una pobre respuesta al tratamiento quimioterápico y un peor pronóstico.

Mcl-1 está sobreexpresado en humanos en otros tipos de cáncer incluyendo colon, pulmón, ovario, próstata, riñón, algunos del sistema nervioso central y melanoma. De hecho, estudios realizados en secciones de parafina de nevus benigno, melanoma primario y melanoma metastásico mostraron un incremento en la expresión de Mcl-1 correlacionada con la progresión del melanoma. Una investigación anterior llevada a cabo con veintiseis muestras de tumores de cabeza y cuello notificaron un incremento del 92% en la expresión de Mcl-1.²⁴ También ha sido demostrada la relación entre Mcl-1 y cáncer de mama, ya que se han identificado líneas celulares dependientes de

Mcl-1 para su supervivencia. ³⁰ Mcl-1 está sobreexpresado además en carcinoma hepatocelular y adenocarcinoma pancreático. Varios estudios comprobaron que el silenciamiento del gen en una línea celular de cáncer de páncreas tenía como consecuencia la disminución de la viabilidad celular, reduciéndose la formación de colonias *in vitro* y el tamaño y peso del tumor en modelos de xenoinjerto. ²⁴

Recientemente se ha descubierto que Mcl-1 promueve el mantenimiento de la morfología de la mitocondria y su producción energética. Además, dependiendo de la localización de Mcl-1 en la mitocondria, esta desempeña una función u otra. La actividad antiapoptótica de Mcl-1 está restringida a su localización en la membrana externa de la mitocondria, mientras que su función como elemento regulador de la fisiología del orgánulo, requiere de su localización en la matriz. ²² Así pues, el balance Mcl-1_L / Mcl-1_S condiciona el correcto funcionamiento de la fusión-fisión mitocondrial. ³⁴

Como se puede observar, Mcl-1 es un factor antiapoptótico esencial para el desarrollo y diferenciación de las células y su desregulación, frecuentemente ocasiona diversas patologías y resistencias hacia los tratamientos empleados. Sin embargo, la regulación a la baja de esta proteína en ocasiones resulta ser suficiente para desencadenar la apoptosis de las células cancerígenas, sugiriendo que Mcl-1 puede ser una diana terapéutica potencial.

3. Mcl-1 como diana terapéutica

Los mecanismos que anulan la función antiapoptótica de Mcl-1 pueden ser divididos en dos categorías: aquellos que disminuyen los niveles de Mcl-1 mediante la inhibición de su expresión y/o inducción de su degradación; y aquellos que detienen la actividad antiapoptótica de Mcl-1 interrumpiendo la interacción Mcl-1-Bak. En los últimos años, se han probado distintas estrategias terapéuticas sobre líneas celulares que sobreexpresan Mcl-1 y los efectos que se han obtenido se han categorizado como específicos o no específicos. Los tratamientos no específicos principalmente incluyen agentes quimioterápicos y se denominan así debido a las consecuencias que su acción provoca sobre un amplio rango de moléculas reguladoras. Por el contrario, los tratamientos específicos incluyen nucleótidos antisentido (ASOs), RNAs de interferencia y BH3 miméticos. ¹⁸

3. 1 Fármacos que disminuyen los niveles de Mcl-1

Existen múltiples fármacos que, a pesar de no haber sido diseñados específicamente para actuar sobre Mcl-1, su mecanismo de acción tiene como consecuencia la disminución de los niveles de esta proteína.

- **Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs).**

- a) **Flavopiridol**

El Flavopiridol es un flavonoide semisintético que actúa como inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) compitiendo por el sitio activo de la enzima. Es capaz de inhibir distintos tipos de CDKs para detener el ciclo celular y reducir los niveles de transcripción. No obstante, una de las consecuencias más interesantes que tiene, es la capacidad para disminuir los niveles de Mcl-1 en leucemia linfocítica crónica. Estudios llevados a cabo con células leucémicas, muestran además que el Flavopiridol interactúa con Vorinostat, un inhibidor de las histona-desacetilasas (HDAC), a través de la proteína Mcl-1. Algo similar ocurre en cáncer de mama, donde se ha demostrado que el tratamiento con Flavopiridol mejora de forma sinérgica la actividad del inhibidor de EGFR/HER2, Lapatinib, de una forma dependiente de Mcl-1. Sin embargo, la sobreexpresión de Mcl-1 induce la resistencia a esta combinación. ²⁴

- b) **Sorafenib**

Sorafenib es un inhibidor multiquinasa que ha demostrado inducir la apoptosis en células leucémicas a través de mecanismos que implican la disminución de Mcl-1. Este hecho fue hallado como consecuencia de la inhibición de la traducción que tiene lugar debido al estrés que provoca el Sorafenib sobre el retículo endoplasmático. ²⁴

- **Inhibidores de la deubiquitinasa**

- a) **WP1130**

Como se indicó anteriormente, Mcl-1 es degradada rápidamente vía proteasoma. El bloqueo del proteasoma puede llevar a estabilizar los niveles de dicha proteína, pero existe una ruta alternativa mediante la cual, la deubiquitinasa USP9X retira la ubiquitina de Mcl-1 impidiendo su degradación. WP1130 es una pequeña molécula capaz de bloquear de forma directa USP9X permitiendo así que tenga lugar la degradación de Mcl-1. WP1130 ha demostrado disminuir los niveles de Mcl-1 en leucemia mieloide crónica, induciendo así la apoptosis de las células. ²⁴

3.2 Tratamiento con oligonucleótidos antisentido (ASO)

A pesar del hecho de que existen numerosos estudios que muestran los efectos del tratamiento con oligonucleótidos antisentido para Mcl-1, tanto en células tumorales *in vitro*, como en modelos animales *in vivo*, apenas existen referencias de efectividad clínica. Esto es debido a distintos acontecimientos que derivan del uso de ASO en humanos. En nuestro organismo, los oligonucleótidos antisentido, tienen una vida media extremadamente corta, lo que dificulta llegar a niveles suficientes en sangre y que puedan llegar así a su diana. Además, las DNAsas pueden degradarlos provocando problemas de estabilidad.²⁴

3.3 BH3-miméticos

El concepto de BH3-miméticos ha sido una de las estrategias terapéuticas más prometedoras en relación a la apoptosis. Como se ha mencionado, los efectos pro o antiapoptóticos en la célula dependen en última instancia de las interacciones físicas entre las proteínas de la familia de Bcl-2 antiapoptóticas y las proteínas que sólo tienen el dominio BH3. Las proteínas antiapoptóticas tienen un bolsillo hidrofóbico formado por sus dominios BH1, BH2 y BH3 al que se unen las proteínas que sólo tienen el dominio BH3.

Basándose en este modelo de interacción, han sido diseñadas pequeñas moléculas con una estructura similar a las proteínas que sólo tienen el dominio BH3, capaces de unirse al bolsillo hidrofóbico anteriormente descrito. De esta forma, son capaces de bloquear la interacción de las proteínas antiapoptóticas con las proteínas proapoptóticas que sólo tienen el dominio BH3, inhibiendo su función.

a) Obatoclax

Obatoclax es un BH3-mimético capaz de unirse a Mcl-1 e interrumpir la interacción Mcl-1-BAK en la membrana externa de la mitocondria. Distintos estudios han mostrado evidencias de que este compuesto produce citotoxicidad en distintos tipos de cáncer como el cáncer de pulmón y leucemias. Además, se comporta de forma sinérgica cuando se combina con otros agentes quimioterápicos convencionales.²⁴

b) Gossypol

Se trata de un aldehído polifenólico que procede de la semilla de algodón. Gossypol tiene una potente actividad anticancerígena y es capaz de unirse a distintas proteínas antiapoptóticas, incluyendo Mcl-1. Este compuesto ha demostrado su eficacia terapéutica en distintos tipos de cáncer incluyendo cáncer de mama, próstata, colon y gliomas. Además, Gossypol es capaz de inhibir el crecimiento de las células de carcinoma de las glándulas adrenales, carcinoma medular tiroideo, carcinoma de ovario y carcinoma de endometrio. Sin embargo, debido a la

reactividad que poseen los dos grupos aldehídos que tiene esta molécula, resulta difícil alcanzar niveles óptimos de Gossypol en sangre. Por ello, se han diseñado derivados sintéticos como el Apogossypol que muestra más eficacia y menos toxicidad que su predecesor. Actualmente existen muchos derivados de Gossypol con distintas afinidades por las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2.²⁴

c) Sabutoclax (BI-97C1)

Sabutoclax es un derivado de Apogossypol capaz de unirse a Bcl-2, Mcl-1, Mcl-X_L y Bfl-1. Induce la apoptosis en el linfoma de las células B, las cuales expresan altos niveles de Mcl-1 y resistencia a otros BH3-miméticos.

Conclusiones

- La muerte celular por apoptosis ha demostrado ser una estrategia esencial para proteger el equilibrio homeostático de los seres vivos.
- El conocimiento de los mecanismos implicados en la regulación de la apoptosis ha avanzado mucho en las últimas décadas, sin embargo, estos no se conocen por completo. Se hace necesario por tanto, incentivar la investigación en este campo debido a la relevancia que la apoptosis supone.
- La alteración en la regulación de la apoptosis está presente en la etiopatogenia de muy diversas enfermedades. El nexo de unión entre las distintas enfermedades relacionadas con la apoptosis es el desequilibrio entre la supervivencia de las células y su destrucción.
- El destino de la célula depende del equilibrio entre los estímulos apoptóticos y los estímulos antiapoptóticos que recibe. Conociendo cuáles son y como modificarlos, se podrá controlar el porvenir de la célula.
- Se ha demostrado que Mcl-1 es una proteína cuya contribución a la regulación de la supervivencia de la célula está rápida y minuciosamente controlada a través de cambios en su transcripción, localización, estabilidad y habilidad para formar dímeros con homólogos de la familia de Bcl-2 y otras proteínas. Por ello, supone una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades en las que se encuentra implicada.

Bibliografía

1. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ. 2009;16(1):3-11.

2. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ. 2012;19(1):107-20.
3. Tait SW, Green DR. *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(9):621-32.
4. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(3):231-41.
5. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. *Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(6). doi: 10.1101/cshperspect.a008672.
6. Richard J. Youle et Al. *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(1):47-59.
7. Martinou, J. C. & Youle, R. J. *Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission?* Cell Death Differ. 2006;13(8), 1291–1295.
8. Newmeyer, D. D. & Ferguson-Miller, S. *Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death*. Cell. 2003;112(4):481–490.
9. Youle, RJ. *Cellular demolition and the rules of engagement*. Science. 2007;315(5813):776–777.
10. Willis, SN. et al. *Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak*. Science. 2007;315(5813):856–859.
11. Oda, E. et al. *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*. Science. 2000;288(5468):1053–1058.
12. Yu, J, Zhang, L, Hwang, PM, Kinzler, KW. & Vogelstein, B. *PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells*. Mol. Cell. 2001;7(3):673–682.
13. Zha, J, Harada, H, Yang, E, Jockel, J. & Korsmeyer, SJ. *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)*. Cell. 1996;87(4):619–628.
14. Li, H, Zhu, H, Xu, CJ. & Yuan, J. *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*. Cell. 1998;94(4):491–501.
15. Luo, X, Budihardjo, I, Zou, H, Slaughter, C. & Wang, X. *Bid, a Bcl-2 interacting protein mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell. 1998;94(4):481–490.
16. Pérez JL. *Manual de Patología general*. 7ª Ed. Barcelona: Elsevier España, S.L; 2013. p.70
17. Ramírez R, Carracedo J, Moreno C, Guerra F. *Apoptosis y Enfermedad*. Alergol Inmunol Clin. 1999;14(6):367-374.

18. Akgul C. *Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer*. Cell. Mol. Life Sci. 2009;66(8):1326-1336.
19. Dorjgochoo T, Xiang Y, Long J, Shi J, Deming S, Xu WH, et al. *Association of Genetic Markers in the BCL-2 Family of Apoptosis-Related Genes with Endometrial Cancer Risk in a Chinese Population*. Plos one. 2013;8(4):e60915.
20. Gomez-Bougie P, Bataille R and Amiot M. *The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells*. Eur. J. Immunol. 2004;34(11):3156-3164.
21. Opferman JT. *Apoptosis in the development of the immune system*. Cell Death and Differentiation. 2008;15(2):234-242.
22. Perciavalle RM and Opferman JT. *Delving Deeper: MCL-1's Contributions to Normal and Cancer*. Biology. Trends Cell Biol. 2013;23(1):22-29.
23. Michels J, Johnson PWM, Packham G. *Mcl-1*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2005;37(2):267-271.
24. Quinn BA, Dash R, Azab B, Sarkar S, Das SK, Kumar S, et al. *Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer*. Expert Opin Investig Drugs. 2011;20(10):1397-1411.
25. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. *Mcl-1; the molecular regulation of protein function*. FEBS Letters. 2010;584(14):2981-2989.
26. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC & Korsmeyer SJ. *Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1*. Nature. 2003;426(6967):671-676.
27. Murphy MP & Caraher E. *Mcl-1 is vital for neutrophil survival*. Immunol. Res. 2015;62(2):225-233. doi: 10.1007/s12026-015-8655-z.
28. Milot E and Filep JG. *Regulation of Neutrophil Survival/Apoptosis by Mcl-1*. TheScientificWorldJournal. 2011;11:1948-1962. doi: 10.1100/2011/131539.
29. Michels J, Foria V, Mead B, Jackson G, Mullee M, Johnson PWM and Packham G. *Immunohistochemical analysis of the antiapoptotic Mcl-1 and Bcl-2 proteins in follicular lymphoma*. British Journal of Haematology. 2006;132(6):743-746.
30. Xiao Y, Nimmer P, Sheppard GS, Bruncko M, Hessler P, Lu X et al. *MCL-1 Is a Key Determinant of Breast Cancer Cell Survival: Validation of MCL-1 Dependency Utilizing a Highly Selective Small Molecule Inhibitor*. Mol Cancer Ther. 2015;14(8):1837-1847
31. Balakrishnan K, Burger JA, Fu M, Doifode T, Wierda WG and Gandhi V. *Regulation of Mcl-1 Expression in Context to Bone Marrow Stromal Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Neoplasia. 2014;16(12):1036-1046.
32. Morciano G, Giorgi C, Balestra D, Marchi S, Perrone D, Pinotti M and Pinton P. *Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death*. Mol. Biol. Cell. 2016; 27(1):20-34.