



Facultad de Medicina, UNAM
Departamento de Bioquímica



Mensaje Bioquímico

Editores: I. Bustos, C. Castañeda, E. Rendón, H. Reyes, I. Romero



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXXIII**. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

DISTROFINAS Y VISIÓN: ASPECTOS NORMALES Y PATOLÓGICOS

Alvaro Rendon

Institut de la Vision, UMRS_968 INSERM UPMC
17 rue Moreau 75012 Paris, France
alvaro.rendon@inserm.fr

Resumen

El primer fenotipo descrito en los pacientes que sufren de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es el degeneramiento muscular progresivo ligado a la ausencia del producto mas largo del gen DMD, la distrofina. Posteriormente se describieron fenotipos no progresivos del sistema nervioso, principalmente deficiencias de tipo cognitivo. Estos trabajos mostraron que a diferencia de las afecciones musculares, estos están ligados a los productos cortos del gen DMD y en particular a la distrofina Dp71. La Dp71 es el producto más ubicuo del gen DMD; se le ha encontrado en un gran número de tejidos, y en particular en el sistema nervioso y la retina. A mediados de los años 90 se descubrió que 80% de los pacientes DMD presentaban una perturbación de la neurotransmisión retiniana. Estos trabajos nos incitaron a estudiar la función de las distrofinas en la retina y en particular de la Dp71 gracias a un cepa de ratones transgénicos que no expresan la Dp71. La primera constatación fue mostrar que la Dp71 no es la única distrofina responsable del la perturbación de la neurotransmisión. Además encontramos que la Dp71 es el único producto del gen DMD que se expresa en las células gliales de Müller junto con la utrofina, una proteína análoga a la distrofina. Gracias a técnicas de biología celular y bioquímica encontramos que la Dp71 es la proteína responsable de la localización del canal de potasio Kir4.1 y el acuoso AQP4, dos proteínas esenciales de la regulación de la homeostasis retiniana. Constatamos que en ausencia de la Dp71, un episodio de isquemia temporal va a provocar un aumento importante de la muerte de las neuronas de la retina, comparada con la cepa de ratones silvestre. A partir de estas observaciones, investigamos la implicación de la Dp71 en la vascularización normal y patológica de la retina. Mostramos que la ausencia de la Dp71 provoca un retardo importante del desarrollo vascular de la retina. El estudio de un modelo de neoangiogénesis nos llevó a constatar que en ausencia de la Dp71 los ratones presentan una resistencia parcial a la oclusión de las vasos retinianos, lo que tiene como consecuencia un desarrollo mucho menor de una neoangiogénesis patológica. Finalmente, durante exámenes clínicos de la visión de ratones deficientes en Dp71, demostramos que estos animales desarrollan una catarata congénita progresiva que no había sido descrita hasta ahora.

En conclusión estas observaciones nos llevan a proponer que la Dp71 juega un papel importante e inesperado en la fisiopatología ocular. Este fenómeno abre numerosas perspectivas terapéuticas innovadoras que se están desarrollando actualmente en nuestro laboratorio.

Palabras clave: Distrofina, visión, Dp71, angiogénesis, catarata.

Abstract

The first phenotype to be described among patients suffering from the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the progressive muscular degeneration related to the absence of the whole DMD gene product, the dystrophin. Various works undertaken thereafter led to the description of other troubles among these patients, affecting in particular their cognitive performances in a non progressive way. These works also made it possible to show that these affections were particularly related to the DMD gene short products and particularly Dp71. Dp71 is the main expressed product of this gene in many tissues of the Central Nervous System including retina. The discovery, in the middle of the 1990's that 80% of the DMD patients present a disturbance of the retinal neurotransmission led us to study the role of the dystrophins and in particular Dp71 in retina using a transgenic mouse strain in which the expression of Dp71 was inactivated. This study led us to show that the Müller Glial Cells express only Dp71 and a protein analogous of dystrophin, the utrophin. We have shown that Dp71 was responsible for the localization of two protein channels, that are essential for the regulation of the retinal homeostasis, the potassium channel Kir4.1 and the aqueous channel AQP4. Moreover the absence of Dp71 induces a significant increase in neuronal death following a transient ischemic event, thus putting forward the implication of Dp71 in the regulation of retinal homeostasis. Since Dp71 is located in retina in the Müller glial cell surrounding retinal vessels and in the inner limiting membrane we studied the role of Dp71 in normal and pathological vascularization of retina. We discovered that absence of Dp71 inhibits postnatal angiogenesis. We also found that Dp71 and its absence influence also pathological situation: in a mouse model of retinopathy of prematurity, its absence has a "vasoprotective" effect against toxicity of high concentration of oxygen and reduces in this way pathological neoangiogenesis. At the time of a clinical study of the Dp71-null mice strain we discovered another pathological phenomenon dependent on the absence of Dp71; the development of a congenital progressive cataract.

In conclusion, our research shows the important and unexpected role of Dp71 in the ocular physiopathology. This phenomenon opens new therapeutical perspectives that are under current investigation in our laboratory

Keywords: Dystrophin, vision, Dp71, angiogenesis, cataract.

Introducción

Las distrofias musculares de Duchenne (DMD) y de Becker (BMD) son enfermedades musculares progresivas que se caracterizan por la ausencia total o parcial de una proteína llamada distrofina. Están ligadas al cromosoma X, afectan a uno de cada 3 500 varones y quienes las padecen mueren durante la tercera década de la vida debido a un paro cardíaco o respiratorio. Otra clase de síntomas es una deficiencia mental no progresiva que afecta aproximadamente al 30% de los pacientes de DMD [1]. Además, si bien ninguna perturbación de tipo visual se había reportado en las últimas décadas, estudios fisiológicos recientes, gracias al empleo del electroretinograma (ERG), mostraron la existencia en más del 80% de los pacientes con DMD y BMD de un ERG anormal en condiciones de adaptación a la oscuridad [2-5]. El ERG es un examen oftalmológico que representa la suma algebraica, en función del tiempo de registro, de los potenciales de acción que aparecen en los diferentes tipos de células excitables de la retina. En consecuencia, la perturbación del ERG de pacientes DMD indica que la distrofina forma parte esencial de los componentes de la respuesta visual y que su ausencia total o parcial perturba la transmisión del influjo nervioso.

La distrofina, la proteína ausente en los pacientes DMD y BMD, esta localizada no solamente en el sarcolema de las fibras musculares esqueléticas, cardíacas o lisas [6] sino también en los sistemas nerviosos, central [7] y periférico [8] y en la retina [9-13]. La mayoría de los conocimientos sobre la función sináptica de la distrofina y de su proteína homóloga la utrofina están basados en estudios de la unión neuromuscular. La retina es uno de los tejidos del sistema nervioso central (SNC) más accesibles y de más fácil manipulación por lo que ha servido de modelo para examinar la estructura y la función sináptica del SNC.

El objetivo del presente capítulo es exponer el estado actual de los estudios de la expresión, función y patología de la familia de distrofinas en el sistema visual. En una primera parte se abordarán brevemente los conocimientos generales sobre la estructura y función de las distrofinas, utrofinas y del complejo de proteínas asociadas (DAPs) en el sistema muscular. En una segunda parte se expondrán los conocimientos sobre las bases celulares y moleculares del fenotipo ERG de pacientes con DMD y BMD, gracias a la utilización de cepas de ratones mutantes del gen DMD. Finalmente, se presentarán los trabajos realizados en los últimos 10 años en el laboratorio del autor, sobre fenotipos diferentes al fenotipo ERG, y que se han estudiado en modelos murinos de la DMD.

Los genes DMD y UTRN y la familia de las distrofinas en el sistema muscular

El gen DMD que codifica a la distrofinas fue identificado en 1987 [14]. Dentro del gen DMD existen al menos siete promotores que regulan su expresión de manera tejido específica y en función del desarrollo. Tres promotores localizados en el extremo 3' codifican tres mRNA de 14 kb que constan de un dominio amino-terminal de unión a actina, un dominio central superenrollado de triple hélice y un dominio carboxilo-terminal con sitios regulatorios y de unión a un complejo de proteínas membranales conocidas como proteínas asociadas a la distrofina (DAPs) [15] (Fig. 1).

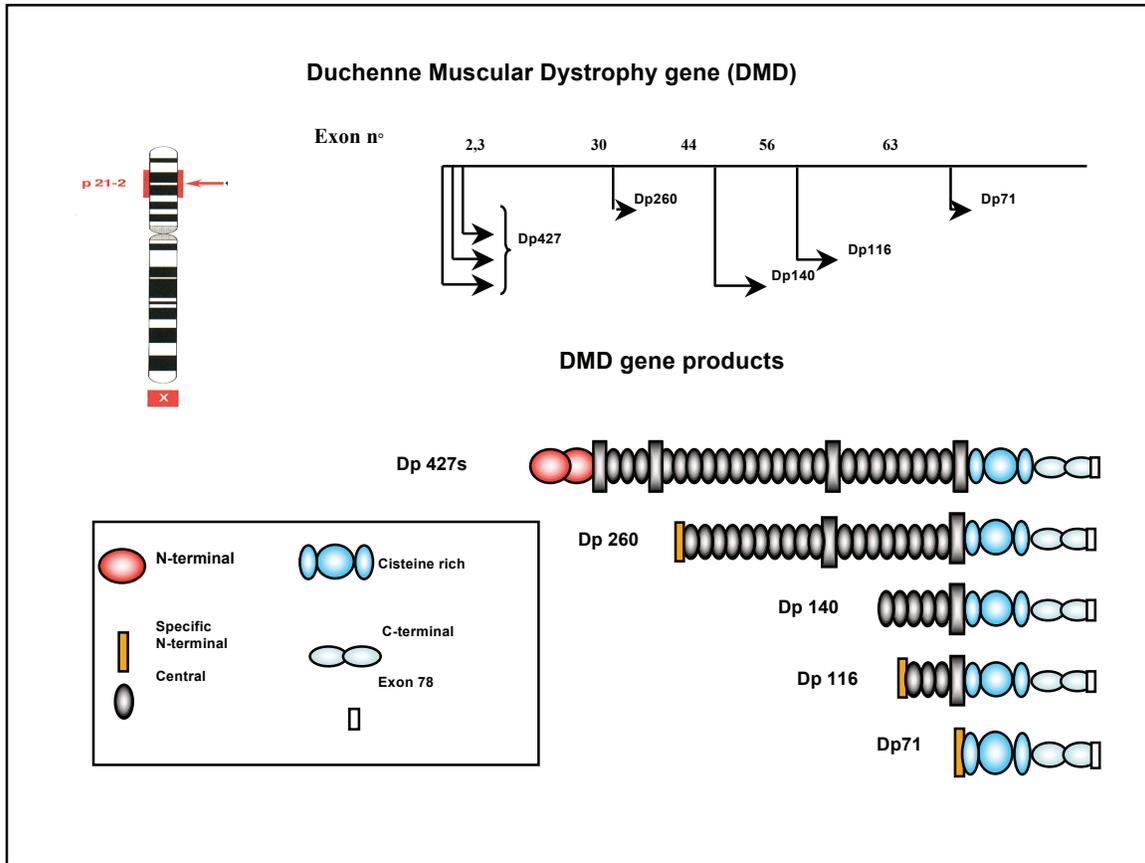


Figura 1. El gen DMD y sus productos. Se muestra la posición del gen DMD en la región P21 del cromosoma X. La localización de los diferentes promotores en el gen y sus productos, que se nombran de acuerdo a su masa molecular (Dp por “Dystrophin protein”). Se representa la estructura primaria de la distrofina (Dp427) y de los productos cortos del gen DMD.

Hacia el extremo 3' existen otros cuatro promotores que dan lugar a productos más pequeños. Alrededor del exón 30 se encuentra el promotor que regula la transcripción de la distrofinas de 260 kDa (Dp260, que se identificó por primera vez en la retina [16]. El siguiente promotor, característico del sistema nervioso central [17] da lugar a una proteína de 140kDa. Otro producto del gen DMD es la Dp116 [8] cuya expresión es característica del sistema nervioso periférico. En el extremo distal del gen, entre los exones 62 y 63 se localiza el promotor de la distrofina Dp71 [18]. Esta distrofina presenta, entre otras variantes generadas por procesamientos alternativos, la remoción del exón 78 que genera un nuevo extremo hidrofóbico con los últimos 31 aa del COOH-terminal [19]. La Dp71 en general se expresa ampliamente en tejido no-muscular, principalmente en los diferentes tipos celulares del sistema nervioso. Se puede decir que es el producto del gen DMD de expresión más ubiitaria.

Dos años después de la descripción del gen DMD, en 1989, Love et al. [20], describieron un transcrito autosómico de 13kb presente en músculo esquelético, homólogo de la distrofina llamado utrofina (UTRN). Este transcrito codifica para una proteína de 400 kDa. Las proteínas distrofina y utrofina, presentan en el extremo NH-terminal una similitud de 85%. En este dominio se identificaron tres sitios de unión a actina [21]. Este primer dominio se ve continuado por un dominio central, que en la distrofina presenta 24 repeticiones separadas por 4 regiones bisagras ricas en prolina y que le dan cierta flexibilidad. Este dominio medio, conocido como dominio

tubular, es el que presenta menor homología entre distrofina y utrofina. Desde el punto de vista funcional, los dominios carboxilo terminal de distrofinas y utrofinas son los más importantes. Esta región tiene una similitud del 83% entre ambas familias e incluye una región rica en cisteínas que la separa del dominio tubular. La importancia de esta región se debe a su sitio de interacción con el β -dístroglicano [22] parte crucial en la conexión entre el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular [23]. Existe una región “EF-hand” de unión a Ca^{2+} [24]. El dominio ZZ, es una estructura que promueve las interacciones proteína-proteína. Las estructuras finales del extremo COOH-terminal contienen los sitios de unión para proteínas que son miembros del complejo DAPs como las sintrofinas [25].

Conforme han avanzado los estudios acerca de los productos de los genes DMD y UTRN, es claro que desempeñan diferentes funciones a lo largo del desarrollo y en los diferentes tejidos de un organismo. Sin embargo, a pesar de las diferencias se han sugerido tres funciones principales para esta familia de proteínas encabezada por las distrofinas: i) estabilidad membranal; ii) transducción de fuerza y iii) organización de especializaciones membranales donde las distrofinas y/o las utrofinas pueden organizar la topología membranal o mantener un complejo membranal fijo en un sitio. En el músculo, la distrofina une a los filamentos de actina con la matriz extracelular a través del complejo DAPs (Fig. 2). De esta manera participa a la unión sarcómero-membrana y funciona como elemento de la transducción de fuerza durante la contracción, o puede participar en la formación de especializaciones como los contactos focales de adhesión. Una de las características de la distrofina es su presencia en regiones especializadas de la membrana post-sináptica de la unión neuromuscular donde va a anclar canales de sodio.

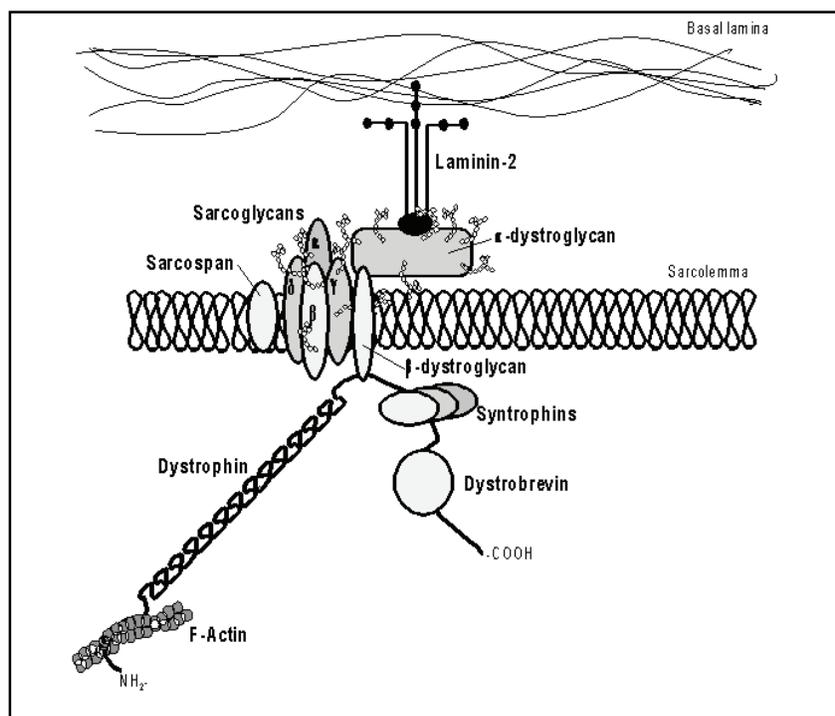


Figura 2. Complejo de proteínas asociadas a distrofina. En el músculo, la distrofina constituye un puente de conexión entre los filamentos de actina y la laminina de la matriz extracelular. El complejo de DAPs está formado por distroglicanos, sarcoglicanos, sarcospan, sintrofinas y distrobrevina.

Por otra parte, los productos del gen DMD desempeñan en el sistema nervioso un papel muy importante puesto que se han detectado los productos pequeños en células nerviosas (neuronales y gliales) del cerebro y de la retina. En el caso de la utrofina, su función es aun menos clara. Se le ha considerado como un análogo fetal de la distrofina y se ha observado que en los ratones mutantes carentes de distrofina (cepa *mdx*) la utrofina incrementa sus niveles [26]. La utrofina también está involucrada de los agrupamientos de receptores de acetilcolina (AChR) en la membrana post-sináptica [27] mediante su interacción con el complejo de DAPs.

Una de las características principales tanto de las distrofinas como de las utrofinas, es su papel como puentes de unión entre el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular a través de las DAPs (Fig. 2). Las proteínas miembros de estos complejos se pueden subdividir en tres grupos principales: (i) el complejo distroglicano, (ii) el complejo sarcoglicano y (iii) las sintrofinas. (i) El complejo distroglicano incluye el α - y el β -distroglicano de una masa molecular de 156 y 43 kDa, respectivamente. Se generan por un mismo precursor a través de corte proteolítico. El α -distroglicano tiene una localización extracelular mientras que el β -distroglicano es una proteína transmembranal que se une a la región rica en cisteínas de las distrofinas y utrofinas. El complejo DAPs presenta una distribución ubicua y se le encuentra tanto en músculo como en tejidos no musculares. Se sabe que este complejo es esencial en las primeras etapas del desarrollo [23]; (ii) El complejo de sarcoglicanos comprende principalmente 5 proteínas designadas como α , β , γ , δ , y ϵ -sarcoglicano. Sus respectivos genes se localizan en diferentes loci autosomales. Estas proteínas, que se expresan predominantemente en músculo, se sugiere que podrían estar involucradas en las interacciones membrana-matriz extracelular; (iii) las sintrofinas se localizan en la parte citoplásmica de la membrana. Las α -, β 1- y β 2-sintrofinas están codificadas por diferentes genes con una masa molecular de ~ 59 kDa. Estas proteínas que se unen a la región distal del extremo carboxilo de las distrofinas y de las utrofinas pueden, por intermedio de dominios ZZ, participar al agrupamiento de proteínas de señalización al complejo DAPs del tipo de la NO sintetasa [28] y a cinasas de serina/treonina asociadas a microtúbulos [29].

ERG y distrofinas en ratones mutantes del gen DMD

El fenotipo mejor caracterizado en el SNC de pacientes con DMD ha sido descrito en el sistema visual. Si bien clínicamente las funciones visuales de los pacientes DMD aparecen completamente normales, se encontró que la respuesta del ERG a un breve flash luminoso en condiciones escotópicas (de adaptación a la obscuridad) presenta una amplitud de la onda b prácticamente inexistente así como un retardo en el tiempo de latencia de su aparición [2-5]. Con el objetivo de analizar las bases celulares y moleculares de este fenotipo se estudiaron varias cepas de ratones mutantes del gene DMD. Se encontró que los ratones deficientes en Dp427 (*mdx*), Dp427 y Dp260 (*mdx*^{2cv}) o Dp427, Dp260 y Dp140 (*mdx*^{4cv}) no presentan las perturbaciones observadas en los pacientes DMD. Mientras que la cepa *mdx*^{3cv} en la cual hay una disminución muy importante de la expresión de todos los productos del gen DMD, si presenta una perturbación de la onda b del ERG similar a la observada en los pacientes DMD [30,31] (Fig. 3).

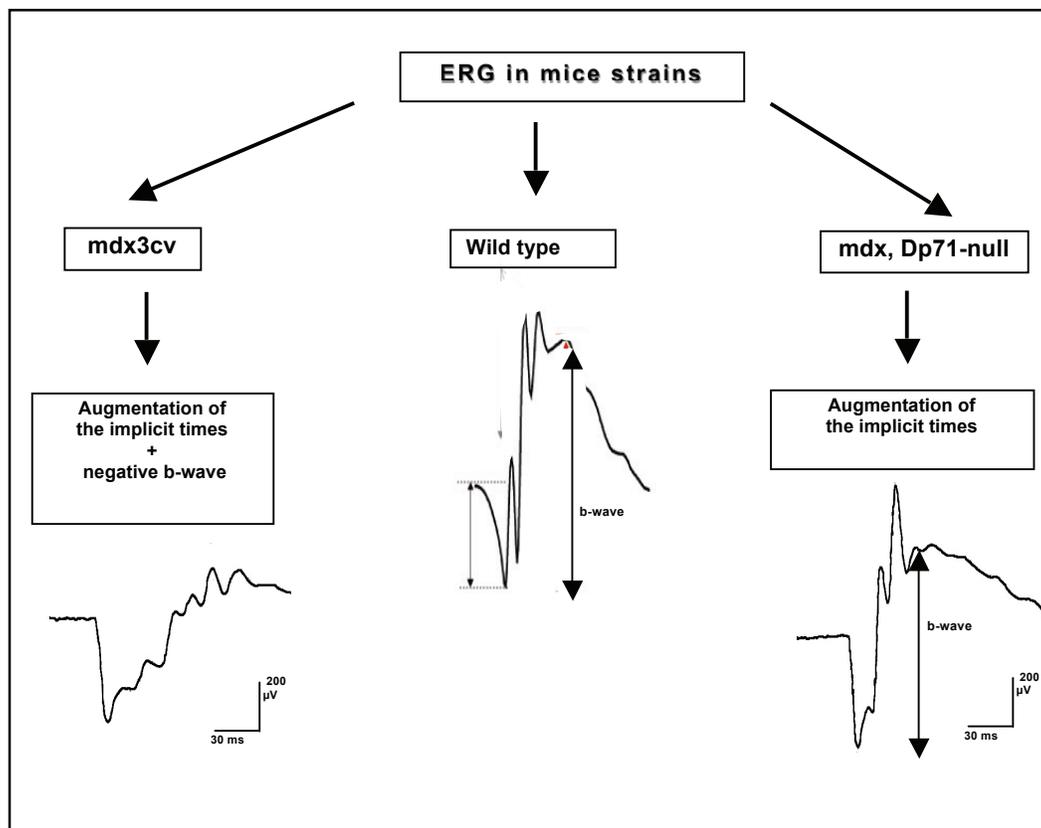


Figura 3. Electroretinograma escotópico de modelos murinos de la DMD. La onda b de las cepas *mdx* (- Dp427) y Dp71-null no se ve modificada con respecto a la cepa silvestre. La cepa *mdx3CV*, (Dp427, Dp260, Dp140 y Dp71) presenta una onda b negativa.

Existen dos hipótesis en la literatura para explicar el origen de la onda b. Las dos conciernen la primera sinapsis de la retina, entre los fotorreceptores y las neuronas secundarias, rodeada por las Células Gliales de Müller (CGM). La primera hipótesis fue atribuida a las neuronas bipolares que expresan el receptor metabotrópico del glutamato mGluR6 que cuando se invalida genéticamente inhibe la formación de la onda b [32]. La onda b se atribuyó a la corriente generada por la actividad de este receptor. El origen de la onda b también se le ha atribuido en parte, a las CGM debido a su función de eliminación del potasio liberado por las neuronas cuando estas se ven activadas. Las CGM recuperan, alrededor de la sinapsis, el potasio para dirigirlo hacia la circulación sanguínea o al cuerpo vítreo con el objeto de regular la homeostasis de la retina. Según esta hipótesis la corriente generada por las CGM sería responsable de la amplificación de la onda b. La proteína central de este fenómeno es el canal de potasio Kir4.1.

El estudio de la expresión de las distrofinas en la cepa silvestre de ratón C57/BL6 permitió mostrar por Western blot que en la retina se expresan la Dp427, la Dp260, la Dp140 y la Dp71 (Fig 4C). Por inmunomarcaje con un anticuerpo panespecífico contra todos los productos del gen DMD e inmunofluorescencia, se observó que las distrofinas se encuentran localizadas en la capa plexiforme externa a nivel de la sinapsis entre los fotorreceptores y las neuronas secundarias así como en las prolongaciones de las CGM que rodean los vasos sanguíneos y en la membrana limitante interna a nivel de los pies de las CGM y los astrocitos (Fig. 4B). Utilizando técnicas diferentes como la RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) o la microscopia electrónica con diferentes anticuerpos, resultados similares a los presentados en la

Fig. 4 han sido reportados por diferentes laboratorios en rata y en ratón [11, 13, 33-42]. Actualmente a pesar de que la localización celular de los productos del gen DMD que se expresan en la retina concuerda con una posible función en la generación de la onda b del ERG, la implicación directa de alguno de estos productos en la función fisiológica del ERG queda por demostrar. A nivel de la capa plexiforme externa las distrofinas podrían ser responsables a nivel pre-sináptico de la localización de canales cálcicos o de receptores de neurotransmisores inhibidores implicados en la liberación de neurotransmisores como el ácido glutámico. Del lado post-sináptico podrían ser responsables de la localización y reagrupamiento de receptores de neurotransmisores como el mGluR6. En todos estos casos la ausencia de las distrofinas provocaría una inestabilidad de las proteínas funcionales, perturbación que daría origen a un ERG con una onda b negativa. Lo que es verdaderamente importante y que difiere del fenotipo ERG humano es que en el ratón es necesaria la disminución de todos los productos del gen DMD (cepa *mdx^{3cv}*) para observar la onda b negativa.

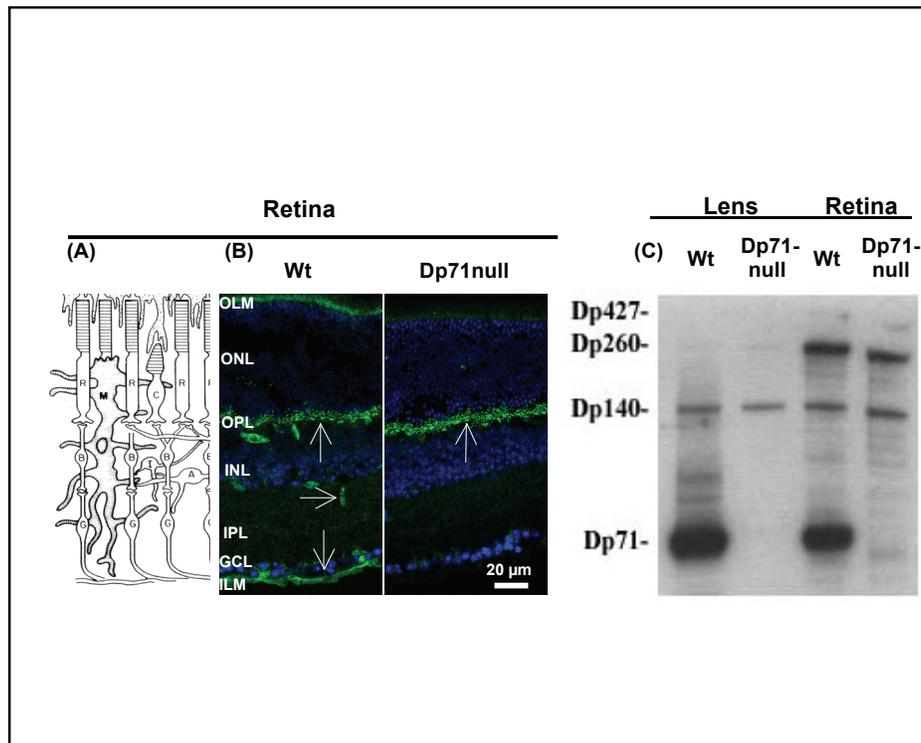


Figura 4. Expresión de distrofinas en la retina y el cristalino de ratón. (A) Esquema de la retina. (B) Inmunolocalización de las distrofinas en retinas de ratón de cepas silvestre y Dp71-null. Las flechas señalan la localización de las distrofinas. En el ratón Dp71-null, la Dp71 desaparece del contorno de los vasos y la limitante interna. Abreviaciones: OLM; Membrana Limitante Externa; ONL; Capa Nuclear Externa; OPL; Capa Plexiforme Externa; INL; Capa Nuclear Interna; IPL; Capa Plexiforme Interna; GCL; Capa de Células Ganglionares; ILM; Capa Limitante Interna. (C) Western blot de la expresión de distrofinas en el cristalino y la retina.

Dp71 y visión; impactos fenotípicos

La distrofina Dp71 es el producto del gen DMD mayoritario en la retina. En nuestro laboratorio se mostró que en la retina de rata, la Dp71 se expresa principalmente en la CGM [40]. A partir de esta observación, el estudio de la función de la Dp71 pudo ser realizado gracias a la utilización de una cepa de ratones deficiente exclusivamente en Dp71 que fue creada en el

laboratorio de David Yaffe (Weizman Institute, Rehovot, Israel) [43]. La cepa Dp71-null se obtuvo reemplazando vía una recombinación homóloga, la mayor parte del 1er exón específico de la Dp71 y una pequeña parte de su 1er intrón, por una secuencia que codifica una proteína quimérica (β -geo), la β -gal-neomicina. De esta manera se invalidó la expresión de la Dp71 sin interferir con la expresión de todos los otros productos del gen DMD. A partir de estas observaciones orientamos nuestra investigación hacia el estudio de las funciones en varias partes del tejido ocular.

Dp 71 y retina

Con el objetivo de investigar la implicación de la Dp71 en el fenotipo ERG, lo primero que estudiamos fue el ERG de retinas de la cepa Dp71-null. El examen del ERG en condiciones escotópicas reveló que la ausencia de Dp71 induce una pequeña disminución de la onda a pero no parece afectar la generación de la onda b.

El análisis comparativo de la localización de los productos del gen DMD en la cepa Dp71-null y la cepa silvestre con un anticuerpo panespecífico de las distrofinas nos permitió confirmar que la Dp71 se localiza exclusivamente en la CGM alrededor de los vasos sanguíneos y en la membrana limitante interna, formada por los pies de las CGM y los astrocitos (Fig. 4). Además se corroboró con este enfoque que los otros productos del gen DMD que se expresan en la retina (Dp427, Dp260 y Dp140) están localizados en la capa plexiforme externa. También observamos un incremento de la expresión de la Dp140 y de la utrofina.

Se sabe que una de las funciones esenciales de las CGM es la regulación de la homeostasis de la retina. Además de controlar las corrientes potásicas y del flujo acuoso, las CGM también son responsables del reciclaje de neurotransmisores, que pueden ser tóxicos si se acumulan en el espacio extra-neuronal. Si la regulación de la homeostasis iónica y de los neurotransmisores es necesaria para la función de las neuronas de la retina en condiciones normales lo es todavía más en condiciones de estrés metabólico. La isquemia es uno de los estreses metabólicos que se produce en diversas patologías oculares como el glaucoma o la retinopatía diabética.

Con base en estas consideraciones estudiamos el impacto de la ausencia de la Dp71 en la localización y las capacidades funcionales del principal canal de potasio de las CGM, el canal Kir4.1. Asimismo estudiamos el canal AQP4 que controla el transporte acuoso transretiniano y que esta íntimamente ligado a las corrientes potásicas. Como se muestra en la Fig. 5 la ausencia de la Dp71 conduce a la deslocalización de Kir4.1 y de AQP4, que se distribuyen a todo lo largo de las CGM en lugar de estar concentradas como en la cepa silvestre, alrededor de los vasos y en la membrana limitante interna. Asimismo se observa que la expresión de AQP4 se ve fuertemente disminuida mientras que la de Kir4.1 no se ve modificada. Estas observaciones se corroboraron por Western blot (resultados no mostrados). La modificación de la localización de estos dos canales en ausencia de Dp71 provocó un incremento de la sensibilidad de las neuronas de la retina a un episodio isquémico transitorio. La supervivencia de las neuronas ganglionares se ve dividida por un factor de 2 en ausencia de Dp71.

En resumen, nuestros resultados muestran que la ausencia únicamente de la Dp71 no induce el fenotipo ERG de la DMD. Asimismo se constata que a pesar de que hay un incremento de la expresión de la Dp140 y la utrofina en ausencia de la Dp71, este incremento no es suficiente, ni desde el punto de vista molecular ni del fisiológico, para impedir la deslocalización de los canales Kir4.1 y AQP4. Nuestro trabajo muestra también que estos dos canales, emparentados fisiológicamente no son regulados de la misma manera. En efecto si la expresión de AQP4 se ve regulada negativamente, la expresión de Kir4.1 no se ve modificada por la ausencia de Dp71. Finalmente, nuestro estudio revela que la Dp71 es una proteína esencial para la regulación de la homeostasis de la retina [44].

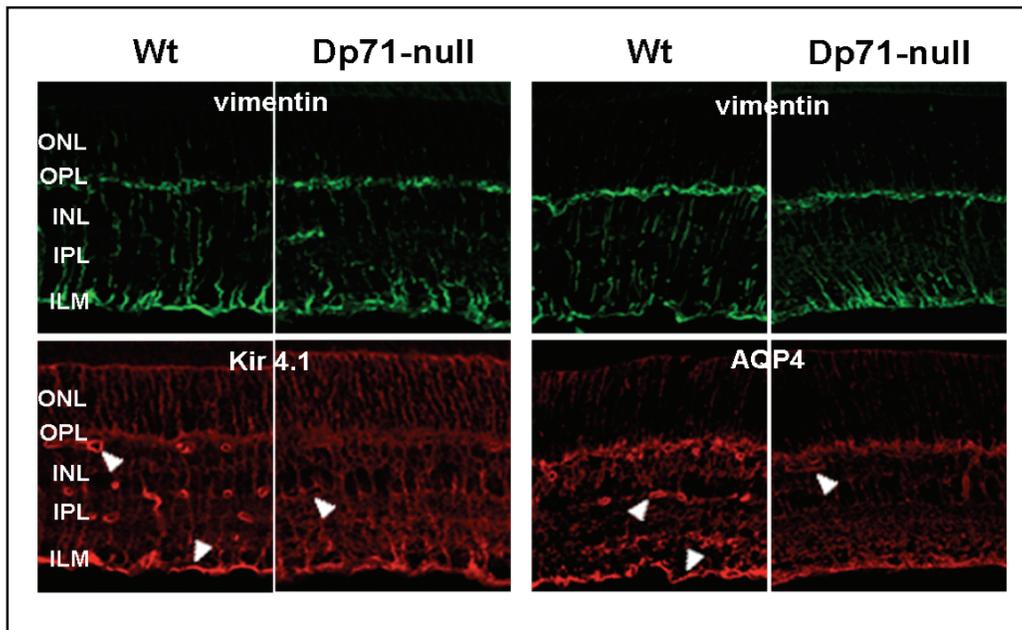


Figura 5. Expresión de Kir4.1 y AQP4 en retina de ratones de cepa silvestre y Dp71-null. En verde la expresión de la vimentina, proteína marcador de Células Gliales de Müller. En rojo la expresión de Kir4.1 y AQP4. En la cepa silvestre ambos canales están localizados alrededor de los vasos y en la membrana limitante interna (cabezas de flecha). En el ratón Dp71-null la localización es difusa. Note la disminución de la expresión de AQP4. Abreviaciones: ONL; Capa Nuclear Externa: OPL; Capa Plexiforme Externa: INL; Capa Nuclear Interna: IPL; Capa Plexiforme Interna: ILM; Capa Limitante Interna.

A partir de estas observaciones nuestro trabajo tomó dos orientaciones: (1) la caracterización del complejo Dp71-DAPs de la CGM responsable de la localización y agrupamiento de Kir4.1 y AQP4 y (2) considerando el contacto íntimo de la CGM y el sistema vascular, y la presencia y función de la Dp71 en estos contactos, investigar el posible impacto fenotípico de la ausencia de la Dp71 en el sistema vascular. Los resultados obtenidos se resumen a continuación.

(1) El primer objetivo fue el de caracterizar las asociaciones intermoleculares de los complejos Dp71-DAPs alrededor de Kir4.1 y AQP4 en MGC murinas, sin la interferencia de los diferentes productos del gen DMD y DAPs que se expresan en la retina, así como de investigar la asociación posible de estos complejos con la utrofina. Con esta finalidad utilizamos las técnicas de microscopía de fluorescencia de CGM aisladas y de co-inmunoprecipitación a partir de fracciones de pies de CGM, ambas fracciones recuperadas a partir de retinas de ratones de cepas silvestres y Dp71-null. Se identificaron dos tipos de complejos en los pies de las CGM de retinas de cepa silvestre, uno asociado a la Dp71 y el otro a la utrofina. La ablación de la Dp71 provoca la dislocación del complejo DAPs correspondiente que se ve acompañada del incremento de la utrofina y de la formación de un complejo con el canal Kir4.1 que se distribuye a todo lo largo de la CGM. La deficiencia de la Dp71 tiene también como consecuencia una fuerte disminución de la expresión de AQP4 y de β -distroglicano. Conjuntamente con técnicas de fraccionamiento con detergentes revelamos que el complejo Dp71-DAPs-Kir4.1-AQP4 en las CGM de ratones de cepa silvestre se encuentra asociado a una fracción específica de la membrana, enriquecida en colesterol y GM1, un gangliósido marcador específico de balsas lipídicas [45] (Fig. 6). Estos resultados demostraron una vez más el papel central que juega la

Dp71 en los andamios moleculares responsables del anclaje de los canales Kir4.1 y AQP4 en los pies de las CGM. Asimismo, muestran que a pesar de la estrecha relación que existe entre las distrofinas y las utrofinas, estas últimas son incapaces de remplazar completamente las funciones fisiológicas de la distrofina.

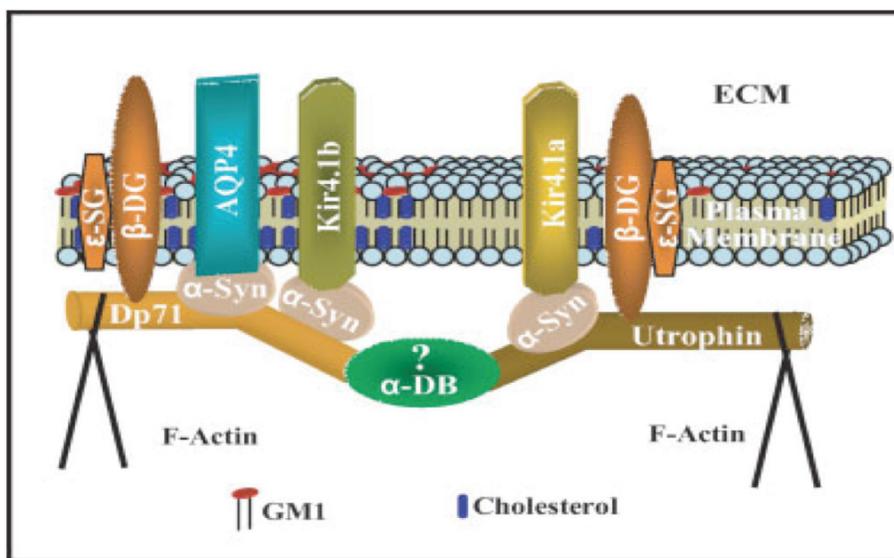


Figura 6. Complejo hipotético de la Dp71 y de la utrofina-DAPs que se ligan a Kir4.1 y AQP4. El complejo Dp71-DAPs/Kir4.1-AQP4 se encuentra localizado en un dominio membranal enriquecido en colesterol y el gangliosido GM1, característicos de balsas lipídicas. El complejo utrofina-DAPs puede ligar Kir4.1 pero es incapaz de ligar AQP4.

(2) Por lo que se refiere al estudio de la implicación de la Dp71 en la fisiopatología vascular, la retina constituye un modelo interesante para el análisis tanto de la angiogénesis normal como la patológica. El desarrollo postnatal de la red vascular de la retina toma lugar después del nacimiento y sigue un patrón de desarrollo espacio-temporal bien definido y reproducible: al nacimiento se inicia a nivel del nervio óptico, se desarrolla radialmente hacia la periferia en la superficie de la retina del día postnatal (P) P1 a P10, para después formar una red profunda (de P8 a P12). Se sabe que tanto los astrocitos como las CGM juegan un papel esencial como soportes del desarrollo, así como en la producción de factores que van a inducir el desarrollo vascular como el “vascular endothelial growth factor (VEGF)” [46]. Llevamos a cabo un estudio comparativo del desarrollo vascular en retinas de ratones de cepa silvestre y Dp71-null. El desarrollo de los vasos de la red interna se realizó cada 3 días a partir del nacimiento. Como se observa en la Fig. 7, en el ratón Dp71-null la primera red de vascularización presenta un retardo significativo con respecto a la cepa silvestre, especialmente durante los primeros 6 días después del nacimiento, sin embargo a P12 la red se asemeja a la observada en la cepa silvestre. La vascularización de la segunda red presenta igualmente un retardo similar al observado en el desarrollo de la primera red vascular [R. Tadayoni, Tesis de Doctorado].

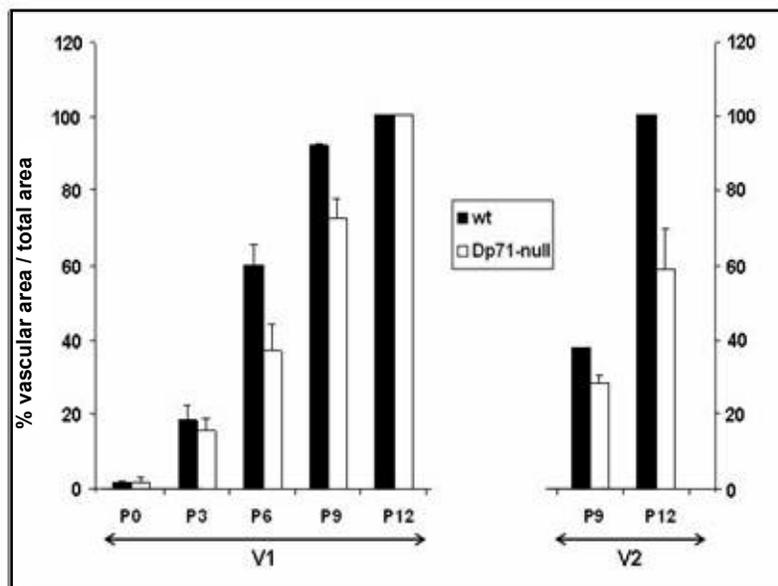


Figura 7. Desarrollo postnatal de la vascularización de la retina en ratones de cepas silvestre y Dp71-null. V1, primera red de vascularización. V2, segunda red de vascularización. La ausencia de Dp71 provoca un retardo en el desarrollo de las dos redes.

Además del estudio de la angiogénesis normal se hizo un estudio de la neoangiogénesis patológica utilizando el modelo murino de la retinopatía de los prematuros en el humano. En este modelo la retinopatía es inducida por el oxígeno. Cinco días después del nacimiento los ratones son expuestos a un medio de hiperoxígeno en una cámara cerrada durante 7 días. Esta manipulación induce la vaso-oclusión en áreas de la retina alrededor del disco óptico. Cuando los ratones se regresan a una atmósfera normal, estas áreas de la retina sufren de hipoxia y van a secretar factores angiogénicos que van a provocar una neoangiogénesis patológica de la retina. Se encontró que en el caso de los ratones de la cepa Dp71-null la neoangiogénesis se ve reducida 39% con respecto a la cepa silvestre (resultados no presentados). Esta observación nos permite concluir que la ausencia de Dp71 tiene un efecto vaso-protector de la retina en periodo de hipoxia.

Dp71 y cristalino

El cristalino es una parte del sistema visual que se caracteriza por una organización estructural que le permite permanecer transparente durante toda la vida del ser humano. Se han identificado proteínas del citoesqueleto como la actina o la vimentina que son responsables de la subsistencia de esta organización. El cristalino se caracteriza igualmente por su alto grado de hidratación. Se sabe que la más mínima perturbación de esta organización va a producir una opacificación que se va a traducir en la presencia de una catarata. Antes de nuestros trabajos, ningún estudio había entrevisto la posibilidad de investigar si las distrofinas se expresan o no en el cristalino y si su presencia podría intervenir en su organización estructural. En nuestro laboratorio, durante un estudio clínico de la visión de ratones de la cepa Dp71-null descubrimos la presencia de una catarata. Esta observación nos indujo a investigar la o las posibles funciones que la Dp71 puede tener en el cristalino.

Iniciamos nuestro trabajo por un estudio epidemiológico del envejecimiento del cristalino en presencia o en ausencia de la Dp71. Encontramos una opacificación cortical visible en un cierto número de ratones Dp71-null a partir de los 2 meses de edad y que se generaliza a la edad de 7 meses (Fig. 8). El análisis histológico muestra la aparición de vacuolas y desechos celulares a partir de los 2 meses de edad; degeneración que aumenta progresivamente con la edad de los ratones. El análisis por Western blot de la expresión de las distrofinas muestra que son la Dp260, la Dp140 y la Dp71 los productos del gen DMD que se expresan en el cristalino (Fig. 4). Gracias al inmunomarcaje de la proteína Acuaporina 0, también observamos que la ausencia de la Dp71 se traduce por una desorganización de las fibras cristalinas.

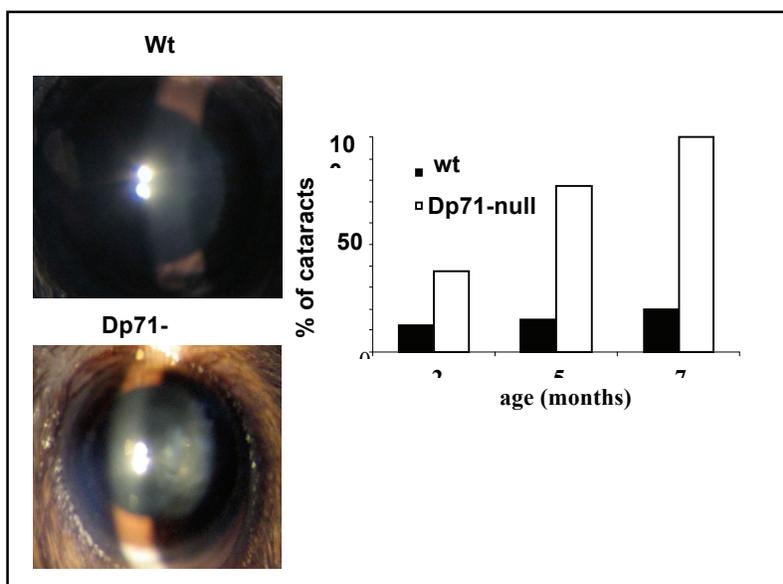


Figura 8. Análisis comparativo de la formación de cataratas en ratones de cepa silvestre y Dp71-null. A la izquierda imágenes de una catarata de ratón de cepa silvestre y Dp71-null. La ausencia de Dp71 induce la formación de cataratas en toda la población de ratones Dp71-null.

En conclusión podemos afirmar que la Dp71 participa a la organización de las fibras del cristalino y su ausencia provoca su desorganización que conduce al desarrollo de una catarata congénita progresiva. Nuestros resultados describen por primera vez en un tejido no-muscular un fenotipo progresivo que no resulta de la ausencia de la distrofina Dp427, si no de otro producto del gen DMD: la Dp71. [Patrice Fort y Ramin Tadayoni, tesis de doctorado y artículo en preparación].

Referencias

1. Bresolin, N., Castelli, E., Comi, G. P., Felisari, G., Bardoni, A., Perani, D., Grassi, F., Turconi, A., Mazzucchelli, F., Gallotti, D., et al. (1994) *Neuromuscul. Disord.* **4**, 359-369
2. Cibis, G. W., Fitzgerald, K. M., Harris, D. J., Rothberg, P. G. y Rupani, M. (1993) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 3646-3652
3. Pillers, D. A., Bulman, D. E., Weleber, R. G., Sigesmund, D. A., Musarella, M. A., Powell, B. R., Murphey, W. H., Westall, C., Panton, C., Becker, L. E., and et al. (1993) *Nature genetics.* **4**, 82-86
4. Fitzgerald, K. M., Cibis, G. W., Giambrone, S. A., and Harris, D. J. (1994) *The J. Clin. Invest.* **93**, 2425-2430

5. Sigesmund, D. A., Weleber, R. G., Pillers, D. A., Westall, C. A., Panton, C. M., Powell, B. R., Heon, E., Murphey, W. H., Musarella, M. A., and Ray, P. N. (1994) *Ophthalmology*. **101**, 856-865
6. Arahata, K., and Engel, A. G. (1988) *Ann. Neurol.* **23**, 168-173
7. Jung, D., Pons, F., Leger, J. J., Aunis, D., and Rendon, A. (1991) *Neurosci. Lett.* **124**, 87-91
8. Byers, T. J., Lidov, H. G., and Kunkel, L. M. (1993) *Nat. Genet.* **4**, 77-81
9. Zhao, J., Uchino, M., Yoshioka, K., Miyatake, M., and Miike, T. (1991) *Brain Develop.* **13**, 135-137
10. Schmitz, F., Holbach, M., and Drenckhahn, D. (1993) *Histochemistry* **100**, 473-479
11. Ueda, H., Kobayashi, T., Mitsui, K., Tsurugi, K., Tsukahara, S., and Ohno, S. (1995) *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **36**, 2318-2322
12. Ueda, H., Baba, T., Terada, N., Kato, Y., Tsukahara, S., and Ohno, S. (1997) *Histochem. Cell Biol.* **108**, 243-248
13. Rodius, F., Claudepierre, T., Rosas-Vargas, H., Cisneros, B., Montanez, C., Dreyfus, H., Mornet, D., and Rendon, A. (1997) *Neuroreport*. **8**, 2383-2387
14. Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., and Kunkel, L. M. (1987) *Cell* **50**, 509-517
15. Winder, S. J. (1997) *J. Mus. Res. Cell Mot.* **18**, 617-629
16. D'Souza, V. N., Nguyen, T. M., Morris, G. E., Karges, W., Pillers, D. A., and Ray, P. N. (1995) *Hum. Mol. Genet.* **4**, 837-842
17. Lidov, H. G., Selig, S., and Kunkel, L. M. (1995) *Hum. Mol. Genet.* **4**, 329-335
18. Lederfein, D., Yaffe, D., and Nudel, U. (1993) *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1883-1888
19. Lederfein, D., Levy, Z., Augier, N., Mornet, D., Morris, G., Fuchs, O., Yaffe, D., and Nudel, U. (1992) *PNAS. USA.* **89**, 5346-5350
20. Love, D. R., Hill, D. F., Dickson, G., Spurr, N. K., Byth, B. C., Marsden, R. F., Walsh, F. S., Edwards, Y. H., and Davies, K. E. (1989) *Nature* **339**, 55-58
21. Levine, B. A., Moir, A. J., Patchell, V. B., and Perry, S. V. (1992) *FEBS Lett.* **298**, 44-48
22. Campbell, K. P., and Kahl, S. D. (1989) *Nature* **338**, 259-262
23. Williamson, R. A., Henry, M. D., Daniels, K. J., Hrstka, R. F., Lee, J. C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnya, O., and Campbell, K. P. (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6**, 831-841
24. Milner, R. E., Busaan, J., and Michalak, M. (1992) *Biochem. J.* **288**, 1037-1044
25. Blake, D. J., Tinsley, J. M., Davies, K. E., Knight, A. E., Winder, S. J., and Kendrick-Jones, J. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 133-135
26. Jasmin, B. J., Alameddine, H., Lunde, J. A., Stetzkowski-Marden, F., Collin, H., Tinsley, J. M., Davies, K. E., Tome, F. M., Parry, D. J., and Cartaud, J. (1995) *FEBS Lett.* **374**, 393-398
27. Guo, W. X., Nichol, M., and Merlie, J. P. (1996) *FEBS Lett.* **398**, 259-264
28. Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C., and Brecht, D. S. (1996) *Cell* **84**, 757-767
29. Lumeng, C., Phelps, S., Crawford, G. E., Walden, P. D., Barald, K., and Chamberlain, J. S. (1999) *Nat. Neurosci.* **2**, 611-617
30. Pillers, D. A., Fitzgerald, K. M., Duncan, N. M., Rash, S. M., White, R. A., Dwinnell, S. J., Powell, B. R., Schnur, R. E., Ray, P. N., Cibis, G. W., and Weleber, R. G. (1999) *Hum. Genet.* **105**, 2-9
31. Dalloz, C., Claudepierre, T., Rodius, F., Mornet, D., Sahel, J., and Rendon, A. (2001) *Mol. Cell. Neurosci.* **17**, 908-920
32. Masu, M., Iwakabe, H., Tagawa, Y., Miyoshi, T., Yamashita, M., Fukuda, Y., Sasaki, H., Hiroi, K., Nakamura, Y., Shigemoto, R., and et al. (1995) *Cell* **80**, 757-765
33. Ueda, H., Tsukahara, S., Kobayashi, T., and Ohno, S. (1995) *Ophthalm. Res.* **27**, 219-226
34. Montanaro, F., Carbonetto, S., Campbell, K. P., and Lindenbaum, M. (1995) *J. Neurosci. Res.* **42**(4), 528-538
35. Kameya, S., Araki, E., Katsuki, M., Mizota, A., Adachi, E., Nakahara, K., Nonaka, I., Sakuragi, S., Takeda, S., and Nabeshima, Y. (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6**, 2195-2203
36. Ueda, H., Kato, Y., Baba, T., Terada, N., Fujii, Y., Tsukahara, S., and Ohno, S. (1997) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 1627-1630

37. Koulen, P., Blank, M., and Kroger, S. (1998) *J. Neurosci. Res.* **51**, 735-747
38. Howard, P. L., Dally, G. Y., Wong, M. H., Ho, A., Weleber, R. G., Pillers, D. A., and Ray, P. N. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1385-1391
39. Blank, M., Koulen, P., Blake, D. J., and Kroger, S. (1999) *Eur. J. neurosci.* **11**, 2121-2133
40. Claudepierre, T., Rodius, F., Frasson, M., Fontaine, V., Picaud, S., Dreyfus, H., Mornet, D., and Rendon, A. (1999) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1520-1529
41. Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., Sahel, J., and Rendon, A. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 3409-3417
42. Claudepierre, T., Mornet, D., Pannicke, T., Forster, V., Dalloz, C., Bolanos, F., Sahel, J., Reichenbach, A., and Rendon, A. (2000) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 294-304
43. Sarig, R., Mezger-Lallemand, V., Gitelman, I., Davis, C., Fuchs, O., Yaffe, D., and Nudel, U. (1999) *Hum. Mol. Gen.* **8**, 1-10
44. Dalloz, C., Sarig, R., Fort, P., Yaffe, D., Bordais, A., Pannicke, T., Grosche, J., Mornet, D., Reichenbach, A., Sahel, J., Nudel, U., and Rendon, A. (2003) *Hum. Mol. Gen.* **12**, 1543-1554
45. Fort, P. E., Sene, A., Pannicke, T., Roux, M. J., Forster, V., Mornet, D., Nudel, U., Yaffe, D., Reichenbach, A., Sahel, J. A., and Rendon, A. (2008) *Glia* **56**(6), 597-610
46. Gariano, R. F., and Gardner, T. W. (2005) *Nature* **438**(7070), 960-966

Semblanza del Dr. Alvaro Rendon



El Dr. Alvaro Rendon es Biólogo de la UNAM, cuyos estudios doctorales fueron realizados en la Facultad de Ciencias de Estrasburgo, Francia. Realizó estudios posdoctorales en la Universidad de California y en el Instituto Tecnológico de Haifa, Israel. Ha sido profesor invitado en las Universidades de Tokio, Japón, y de Firenze, Italia; así como del CINVESTAV en México. Es coordinador de la red internacional de "Distrofinas del Sistema Nervioso", esta red incluye investigadores de diversos países como Argelia, Francia, Hungría, Israel, Italia y México. El Dr. Rendon ha tenido como temas de investigación la translocación de proteínas a través de las

membranas biológicas, el estudio de proteínas del citoesqueleto asociadas a la membrana, dentro del contexto de función en el transporte axonal de organitos membranales. Actualmente su área de investigación involucra el estudio de la expresión y función de la superfamilia de proteínas de distrofinas en el sistema nervioso central. El Dr. Rendon tiene múltiples publicaciones de alto prestigio a nivel internacional. En la actualidad, el Dr. Alvaro Rendon es Director de Investigación de 2º nivel del Centro Nacional de la Investigación Científica (CNRS) de Francia.

MENSAJE BIOQUÍMICO

EDITORES:

**ISMAEL BUSTOS JAIMES
CRISTINA CASTAÑEDA PATLÁN
ERIKA RENDÓN HUERTA
HORACIO REYES VIVAS
IRMA ROMERO ÁLVAREZ**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

VOL. XXXIII

2009

PORTADA

La Espiga, Escultura de Rufino Tamayo en Ciudad Universitaria
Universidad Nacional Autónoma de México.

Foto: Carmina Montiel

DISEÑO

Lic. Julieta Ambriz Laguna

Lic. Liliana Garrido

ORGANIZADOR

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNAM**

Derechos reservados conforme a la ley
©2009. Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D. F.

ISSN-0188-137X

MENSAJE BIOQUÍMICO es una publicación anual, editada por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Interior de la Ciudad Universitaria, México, D.F., 04510. Editor Responsable ISMAEL BUSTOS JAIMES. Número de Certificado de Licitud de Título (5552). Número de Certificado de Licitud de Contenido (4295). Número de Reserva al Título de Derechos de Autor (648-91). Distribuido por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Impreso en los Talleres de la Facultad de Medicina de la UNAM.

ÍNDICE

EDITORIAL	VII
AGRADECIMIENTOS	IX
PROGRAMA	X
EL CENTRO CULTURAL UNIVERSITARIO: ARTE Y CULTURA PARA TODOS	XV
Alvaro Rendon DISTROFINAS Y VISIÓN: ASPECTOS NORMALES Y PATOLÓGICOS	1
Alicia Ortega, Aldo A. Tirado, Pável Vázquez, Francisco Pérez y Rocío Álvarez EL EJERCICIO INDUCE ESTRÉS OXIDANTE. REGULACIÓN POR REDOX DE LA CONTRACCIÓN/ RELAJACIÓN MUSCULAR	17
Rosario A. Muñoz Clares, Ángel G. Díaz Sánchez, Carmina Montiel CÓMO CONVERTIR UN INHIBIDOR COMPETITIVO EN UN INHIBIDOR INCOMPETITIVO. EL CASO DE LA BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA	31
Libia Vega Loyo MECANISMOS MOLECULARES DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DEL ARSÉNICO	49
Fabián Arechavaleta-Velasco, Laura Díaz-Cueto y Pablo Domínguez-López PESTICIDAS ORGANOCLORADOS Y SUS EFECTOS EN LA ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA	61
Karla G Carvajal Aguilera y Silvia Carrillo Sánchez SEÑALES MOLECULARES QUE MODULAN EL METABOLISMO ENERGÉTICO: IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO DE OBESIDAD, DIABETES Y CARDIOPATÍAS	71

Oscar Juárez y Blanca Barquera	83
METABOLISMO ENERGÉTICO DEL SODIO: ENZIMAS QUE USAN LOS IONES DE SODIO EN LUGAR DE PROTONES	
Laura Kawasaki, Laura Ongay-Larios y Roberto Coria	103
CASCADAS DE MAP CINASAS EN APAREAMIENTO Y ESTRÉS EN LEVADURAS	
Ana Valeria Martínez Silva, Susana De la Torre Díaz y Tzvetanka D. Dinkova	117
LOS FACTORES DE TRADUCCIÓN TIPO EIF4E EN PLANTAS: REDUNDANCIA Y DIVERSIDAD FUNCIONAL	
José Luis Gallegos Pérez	131
APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN PROTEÓMICA PARA LA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES	
Edgar Kröttsch	147
FISIOPATOLOGÍA Y TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS CUTÁNEA	
Héctor Mayani Viveros	155
CÉLULAS TRONCALES Y HEMATOPOYESIS	
Adelfo Escalante, Araceli Valdivia, Guillermo Gosset y Francisco Bolívar	171
INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS EN <i>Escherichia coli</i> PTS- PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS SOBREPDUCTORAS DE SHIKIMATO	
Víctor Manuel Baizabal Aguirre, Javier Oviedo Boyso, Juan José Valdez Alarcón, Alejandro Bravo Patiño y Marcos Cajero Juárez	181
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN ENTRE ESTRUCTURAS CONSERVADAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> Y RECEPTORES CELULARES	



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXXIII**. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

EDITORIAL

El conocimiento es el producto de la investigación científica que el ser humano ha generado desde siempre para comprender todos los procesos de la naturaleza. Actualmente el conocimiento es cada vez más abstracto, puro y teórico; sin embargo, este conocimiento también ha generado un beneficio enorme a la sociedad cuando se aplica a la solución de problemas reales. En este sentido es que la divulgación de la ciencia desempeña un papel importante en la vida actual, en la que la sociedad está cada vez más interesada en tener acceso al conocimiento científico y su manejo de forma cotidiana. La Universidad Nacional Autónoma de México es una Institución comprometida con la sociedad en la generación y difusión de la ciencia a través de foros nacionales e internacionales. En este contexto, el **Taller de Actualización Bioquímica (TAB)**, cumple cabalmente con la función sustantiva de la Universidad de ser un vehículo de difusión de la cultura. El **TAB**, que se ha realizado desde hace 36 años, es un evento académico organizado anualmente por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. El **TAB** es un foro académico que permite la difusión, discusión y actualización del conocimiento científico en el área de la Bioquímica y la Biología Molecular. Este año, contamos con una serie de conferencias cuyos expositores son investigadores nacionales de amplio prestigio, procedentes de distintas universidades e institutos del país. Además contamos con la presencia de destacados investigadores internacionales. El contenido de estas conferencias, como cada año, quedan plasmadas en forma de artículos escritos en español en el libro titulado "**Mensaje Bioquímico**" y que en esta ocasión cumple su edición número XXXIII. Para mayor difusión de este libro se ha creado la versión en línea con libre acceso a partir del volumen XXVI, que corresponde al año 2002.

Este año contamos con el privilegio de presentar un egresado de la UNAM, el Dr. **Alvaro Rendon**, quien actualmente es Director Investigador 2º Nivel del Centro Nacional de Investigación Científica (CNRS), Francia. Él trabaja en el área de enfermedades genéticas y en ocasión de su visita nos hablará de los aspectos normales y patológicos de las distrofinas. Por su parte, la Dra. **Alicia Ortega Aguilar**, una destacada investigadora del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, nos hablará de la regulación por potencial redox del proceso de contracción y relajación muscular. Del mismo modo, la Dra. **Rosario A. Muñoz Clares**, quien es profesora-Investigadora del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM y probablemente la mejor cinetista del planeta, nos hablará de cómo un inhibidor competitivo se puede comportar como inhibidor incompetitivo en la betaína aldehído deshidrogenasa.

En este Taller contamos con ponencias de dos jóvenes investigadores, egresados de la UNAM, quienes desarrollan su investigación en el área de la toxicología. En primer lugar la Dra. **Libia Vega Loyo**, quien pertenece a la sección externa de Toxicología, CINVESTAV-IPN, nos platicará de los mecanismos moleculares de los efectos biológicos del arsénico. Por otra parte, el Dr. **Fabián Arechavaleta-Velasco**, Investigador Asociado en la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva del IMSS, nos hablará de los efectos que tienen los pesticidas organoclorados en la esteroidogénesis, investigación encaminada a entender el efecto tóxico de los

pesticidas sobre el trofoblasto humano y sus implicaciones en la salud materno-fetal. En el campo del síndrome metabólico y la obesidad, contamos con la participación de la Dra. **Karla Guadalupe Carvajal Aguilera**, investigadora del Instituto Nacional de Pediatría, cuya ponencia estará enfocada a determinar las señales moleculares que modulan el metabolismo energético y sus implicaciones en la obesidad, la diabetes y las cardiopatías. Así mismo, la Dra. **Blanca Barquera**, una joven y talentosa investigadora egresada de la UNAM, quien se ha dedicado al estudio bioquímico y biofísico de las proteínas de membrana y fisiología bacteriana y que actualmente tiene su laboratorio en el Departamento de Biología del *Center for Biotechnology and Interdisciplinary Studies, Rensselaer Polytechnic Institute* en Nueva York. nos hablará del metabolismo energético del sodio en bacterias, utilizando como modelo a *Vibrio cholerae*. Otro investigador que ha hecho importantes contribuciones al entendimiento del transporte de iones a través de la membrana plasmática y en transducción de señales, es el Dr. **Roberto Coria**, investigador del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El Dr. Coria nos hablará de las cascadas de MAP cinasa y su función durante el apareamiento y el estrés en levaduras.

La Dra. **Tzvetanka Dimitrova Dinkova**, joven investigadora formada en la Universidad de la Habana, es profesora asociada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM. La Dra. Dimitrova inicio sus estudios en la UNAM en el área de la regulación mediada por factores de traducción y micro RNA en procesos de desarrollo en plantas. Como especialista en el área, nos hablará de los factores de traducción tipo EIF4E en plantas, enfocándose en sus múltiples formas y funciones. Otro joven investigador, cuyas aportaciones al desarrollo de métodos analíticos de separación y espectrofotometría de masas no son pocas, es el Dr. **José Luis Gallejos Pérez**, quien forma parte del grupo de investigadores del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Su ponencia versará sobre la aplicación de la espectrofotometría de masas en proteómica para la búsqueda de biomarcadores. Por otra parte el Dr. **Edgar Kröttsch Gómez**, quien pertenece al Instituto Nacional de Rehabilitación, ha dedicado su investigación a entender la reparación de tejidos y la angiogénesis terapéutica. El Dr. Kröttsch nos hablará de la fibrosis cutánea, tanto su fisiopatología como su tratamiento. Destacamos la participación de un investigador que ha aportado un gran conocimiento el área de la hematopoyesis, las células troncales y la terapia celular, el Dr. **Héctor Mayani Viveros**, Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Medico Nacional, Siglo XXI. El tema de su ponencia es precisamente el uso de células troncales y la hematopoyesis como herramientas de investigación y terapéuticas.

El Dr. **Adelfo Escalante**, Investigador titular del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, ha realizado estudios sobre la ingeniería de vías metabólicas en bacterias y la búsqueda de genes y microorganismos de interés comercial. En esta ocasión nos hablará de las vías metabólicas en *Escherichia coli* para la obtención de cepas sobreproductoras de shikimato, un metabolito útil en la síntesis de fármacos como el oseltamivir (Tamiflu), un agente terapéutico contra la influenza. Otro investigador que ha enfocado sus estudios en bacterias es el Dr. **Victor M. Baizabal Aguirre**, profesor de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana, San Nicolás Hidalgo, Morelia Michoacan. El Dr. Baizabal nos hablará de la caracterización funcional de la interacción entre las estructuras conservadas de *Staphylococcus aureus* y los receptores celulares. Por último contaremos en la presencia del maestro **Alejandro Moreno Chimal** del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, quien nos mostrará los fundamentos de la propiedad intelectual, la obtención de patentes y las búsquedas tecnológicas. Tópicos de interés para la explotación comercial de los resultados de la investigación científica.

El Comité organizador reconoce el esfuerzo de cada uno de los participantes de este Taller de Actualización Bioquímica y les recuerda que el libro "Mensaje Bioquímico" es un legado invaluable que el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM ha realizado para difundir la ciencia principalmente en el área de Bioquímica y Biología Molecular.

Dra. Cristina Castañeda Patlán
Junio, 2009

AGRADECIMIENTOS

El Comité Editorial agradece el apoyo obtenido a todo el personal académico y administrativo para la organización del XXXVI Taller de Actualización Bioquímica. A continuación mencionaremos a aquellas personas valiosas para que este evento académico cumpliera sus objetivos satisfactoriamente.

En primer lugar queremos agradecer el apoyo incondicional los Dres. **Enrique Luis Graue Wiechers**, Director de la Facultad de Medicina de la UNAM, y **Edgar Zenteno Galindo**, Jefe del Departamento de Bioquímica de la misma Facultad. De manera especial agradecemos al Dr. **Ruperto Patiño Manffer**, Director de la Facultad de Derecho de la UNAM, por su apoyo en la disposición de la Aula Magna “Jacinto Pallares” donde se realiza por tercer año consecutivo el Taller de Actualización Bioquímica. Al mismo tiempo agradecemos el apoyo logístico de la C. Ma. Martha del P. Rábago Murcio, secretaria de asuntos estudiantiles de la Facultad de Derecho por las facilidades otorgadas en el uso esta Aula Magna.

Por la difusión oportuna del Programa del Taller de Actualización Bioquímica agradecemos al Dr. **Hugo E. Huitrón Vera**, Director de la Gaceta UNAM, y a la Sra. Martha Marín Zapata, Jefa del Departamento de Información y Prensa de la Gaceta de la Facultad de Medicina. De igual forma agradecemos a la Sra. **Patricia Peña Sobarzo**, Directora del Boletín “El Faro, la luz de la ciencia”, publicación de la Coordinación de la Investigación Científica.

Para la elaboración del “Mensaje Bioquímico” ha sido incondicional y total el apoyo de la Lic. **Julieta Ambroz Laguna** y a todo el personal de diseño gráfico a su cargo, para la impresión de los carteles, trípticos, figuras a color y portada de este libro.

A todo el personal de imprenta, en especial al Sr. **Francisco Javier Islas Hernández**, Jefe del Departamento de Impresos, y personal a su cargo.

Dentro del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, queremos agradecer el apoyo del C.P. **Pedro Hernández Martínez** y al personal administrativo a su cargo. Las señoras **Marivel Rojas García** y **Rosa María López Mendoza** de quienes recibimos un incondicional apoyo en las diferentes etapas de la organización de este evento académico.

Por último, queremos agradecer a las empresas patrocinadoras: **MILLIPORE** y **UNIPARTS**, que incluso en este periodo de crisis nos han brindado su apoyo.

XXXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 3 al 5 de agosto de 2009

HORA	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES
8:30-9:00	INAUGURACIÓN		
9:00-10:00	Dr. Alvaro Rendon Institut de la Vision INSERM-UPMC, Paris <i>"Distrofinas y visión: aspectos normales y patológicos"</i>	Dra. Karla Carvajal Instituto Nacional de Pediatría, México <i>"Señales moleculares que modulan el metabolismo energético: implicaciones en el desarrollo de obesidad, diabetes y cardiopatías"</i>	Dr. Edgar Kröttsch Instituto Nacional de Rehabilitación, México <i>"Fisiopatología y tratamiento de la fibrosis cutánea"</i>
10:00-11:00	Dra. Alicia Ortega Aguilar Facultad de Medicina, UNAM <i>"El ejercicio induce estrés oxidante. Regulación por redox de la contracción/relajación muscular"</i>	Dra. Blanca Barquera Center of Biotechnology and Interdisciplinary Studies, RPI, Troy, NY <i>"Metabolismo energético del sodio: enzimas que usan los iones de sodio en lugar de protones"</i>	Dr. Héctor Mayani Viveros Hospital de Oncología, CMN Siglo XXI, IMSS <i>"Células troncales y hematopoyesis"</i>
11:00-11:20	RECESO	RECESO	RECESO
11:20-12:20	Dra. Rosario A. Muñoz Clares Facultad de Química, UNAM <i>"Cómo convertir un inhibidor competitivo en un inhibidor incompetitivo. El caso de la betaína aldehído deshidrogenasa"</i>	Dr. Roberto Coria Ortega Instituto de Fisiología Celular, UNAM <i>"Cascadas de MAP cinasas en apareamiento y estrés en levaduras"</i>	Dr. Adelfo Escalante Lozada Instituto de Biotecnología, UNAM <i>"Ingeniería de vías metabólicas en Escherichia coli PTS- para la obtención de cepas sobreproductoras de shikimato"</i>
12:20-13:20	Dra. Libia Vega Loyo CIVESTAV-IPN <i>"Mecanismos moleculares de los efectos biológicos del arsénico"</i>	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova Facultad de Química, UNAM <i>"Los factores de traducción tipo eIF4E en plantas: redundancia y diversidad funcional"</i>	Dr. Víctor M. Baizabal Aguirre Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH <i>"Caracterización funcional de la interacción entre las estructuras conservadas de Staphylococcus aureus y receptores celulares"</i>
13:20-15:00	COMIDA	COMIDA	COMIDA
15:00-16:00	Dr. Fabián Arechavaleta Velasco Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva, IMSS <i>"Pesticidas organoclorados y sus efectos en la esteroidogénesis"</i>	Dr. José Luis Gallegos Pérez Instituto Nacional de Medicina Genómica <i>"Aplicación de la espectrometría de masas en proteómica para la búsqueda de biomarcadores"</i>	M. en C. Alejandro Moreno Chimal Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial <i>"Búsquedas tecnológicas"</i>
16:00-17:00	M. en C. Alejandro Moreno Chimal Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial <i>"La propiedad intelectual"</i>	M. en C. Alejandro Moreno Chimal Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial <i>"Patentes"</i>	

XXXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 3 al 5 de agosto de 2009

LUNES

8:30 Registro e Inscripciones

8:50 Inauguración. **Dr. Enrique Luis Graue Wiechers**, Director de la Facultad de Medicina, UNAM

Conferencias:

9:00-10:00

Dr. Alvaro Rendon

Institut de la Vision UMR_S 968 INSERM-UPMC, Paris

"Distrofinas y visión: aspectos normales y patológicos"

10:00-11:00

Dra. Alicia Ortega Aguilar

Facultad de Medicina, UNAM

"El ejercicio induce estrés oxidante. Regulación por redox de la contracción/relajación muscular"

11:20-12:20

Dra. Rosario A. Muñoz Clares

Facultad de Química, UNAM

"Cómo convertir un inhibidor competitivo en un inhibidor incompetitivo. El caso de la betaina aldehído deshidrogenasa"

12:20-13:20

Dra. Libia Vega Loyo

Sección Externa de Biotecnología, CIVESTAV-IPN

"Mecanismos moleculares de los efectos biológicos del arsénico"

15:00-16:00

Dr. Fabián Arechavaleta Velasco

Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva, IMSS

"Pesticidas organoclorados y sus efectos en la esteroidogénesis"

16:00-17:00

M. en C. Alejandro Moreno Chimal

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

"La propiedad intelectual"

XXXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 3 al 5 de agosto de 2009

MARTES

9:00-10:00

Dra. Karla Carvajal

Instituto Nacional de Pediatría, México

"Señales moleculares que modulan el metabolismo energético: implicaciones en el desarrollo de obesidad, diabetes y cardiopatías"

10:00-11:00

Dra. Blanca Barquera

Center of Biotechnology and Interdisciplinary Studies, RPI, Troy, NY

"Metabolismo energético del sodio: enzimas que usan los iones de sodio en lugar de protones"

11:20-12:20

Dr. Roberto Coria Ortega

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

"Cascadas de MAP cinasas en apareamiento y estrés en levaduras"

12:20-13:20

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Facultad de Química, UNAM

"Los factores de traducción tipo eIF4E en plantas: redundancia y diversidad funcional"

15:00-16:00

Dr. José Luis Gallegos Pérez

Instituto Nacional de Medicina Genómica, México

"Aplicación de la espectrometría de masas en proteómica para la búsqueda de biomarcadores"

16:00-17:00

M. en C. Alejandro Moreno Chimal

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

"Patentes"

XXXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 3 al 5 de agosto de 2009

MIÉRCOLES

9:00-10:00

Dr. Edgar Kröttsch

Instituto Nacional de Rehabilitación, México

"Fisiopatología y tratamiento de la fibrosis cutánea"

10:00-11:00

Dr. Héctor Mayani Viveros

Hospital de Oncología, CMN Siglo XXI, IMSS

"Células troncales y hematopoyesis"

11:20-12:20

Dr. Adelfo Escalante Lozada

Instituto de Biotecnología, UNAM

"Ingeniería de vías metabólicas en Escherichia coli PTS- para la obtención de cepas sobreproductoras de shikimato"

12:20-13:20

Dr. Víctor M. Baizabal Aguirre

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH

"Caracterización funcional de la interacción entre las estructuras conservadas de Staphylococcus aureus y receptores celulares"

15:00-17:00

M. en C. Alejandro Moreno Chimal

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

"Búsquedas tecnológicas"

XXXVI TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna "Jacinto Pallares", Facultad de Derecho, UNAM
Del 3 al 5 de agosto de 2009

Comité organizador

Ismael Bustos Jaimes
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
ismaelb@unam.mx

Cristina Castañeda Patlán
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
cristi_ccp@yahoo.com

Erika Rendón Huerta
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
erendon@bq.unam.mx

Horacio Reyes Vivas
Departamento de Bioquímica-Genética
Instituto Nacional de Pediatría
hreyesvivas@yahoo.com.mx

Irma Romero Álvarez
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
irma@bq.unam.mx

Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXXIII**. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)



EL CENTRO CULTURAL UNIVERSITARIO: ARTE Y CULTURA PARA TODOS

Ismael Bustos Jaimes

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

Algo de historia

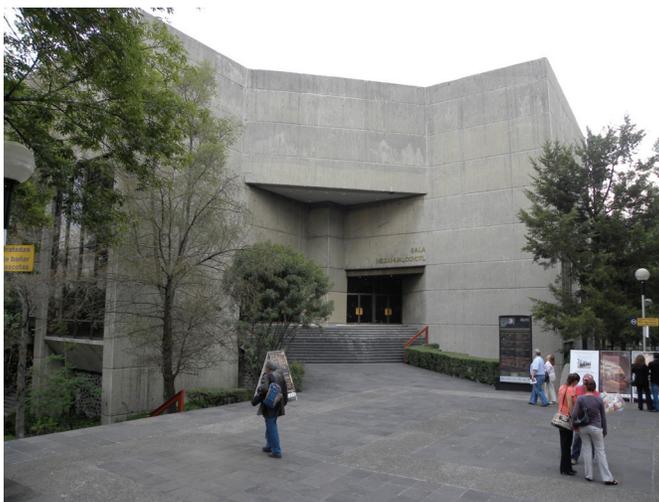
El Centro Cultural Universitario (CCU) nació como un proyecto que apenas concebía una sala de conciertos en los años setenta. Con el paso del tiempo se convirtió en un proyecto cultural mucho más ambicioso, que incluía espacios para las distintas manifestaciones de las bellas artes. Ya en la década de los ochenta, el CCU se convirtió en un espacio de convivencia de arte y cultura no sólo para la comunidad universitaria sino para todos los mexicanos.

En 1976, durante la gestión del Dr. Guillermo Soberón como rector, comienza la construcción del CCU. Desde 1972, a raíz de una huelga del sindicato de la Orquesta Filarmónica Nacional y Radio UNAM, quedó claro que era necesario crear espacios culturales adecuados para llevar a cabo las actividades artísticas. El entonces Director General de Difusión Cultural, Diego Valadés Ríos, propuso la idea de construir la Sala de Conciertos Nezahualcóyotl, la cual fue edificada en el año de 1976, y posteriormente nació la idea de la creación de un centro cultural. Esta fue la respuesta de la Universidad a la necesidad de llevar a cabo una de sus tareas fundamentales.



"La Espiga" de Rufino Tamayo. Escultura emblemática del CCU. Foto: Carmina Montiel.

La construcción de la Sala Nezahualcóyotl inició en enero de 1976 y se inauguró el 30 de diciembre del mismo año con un concierto de la Orquesta Filarmónica de la UNAM. Cuenta con un diseño similar al de otras salas de concierto europeas, en los que la orquesta se encuentra al centro del recinto evitando así estar vecina a una pared. Esto permite que las ondas sonoras lleguen directamente a los oídos de los espectadores que a su vez están situados alrededor de la orquesta. El sonido reflejado por las paredes quebradas y el plafón acústico complementa perfectamente el sonido directo.



Entrada de la Sala Nezahualcóyotl. Foto: Carmina Montiel.

Posteriormente Ernesto de la Torre Villar planteó trasladar la Biblioteca Nacional y la Hemeroteca Nacional del centro de la ciudad al CCU. De este modo este espacio fue transformándose de manera paulatina para concretar el proyecto de 1976 a 1980.

Durante 1978, con la Sala Nezahualcóyotl en pleno uso, se terminaron los proyectos correspondientes a la segunda etapa de construcción del CCU, que incluía la sala de teatro, las salas de proyección cinematográfica, la sala de danza y las oficinas de la Dirección General de Difusión Cultural. El 26 de febrero de 1979 se inauguraron, como parte de los festejos para conmemorar el Cincuentenario de la Autonomía de la Universidad, el Teatro Juan Ruiz de Alarcón y el Foro Experimental Sor Juana Inés de la Cruz, ambos situados dentro de un mismo edificio diseñado por los arquitectos Orso Núñez Ruiz Velasco y Arcadio Artis Espriú, en la vecindad de la Sala Nezahualcóyotl. Durante el mes de abril del mismo año se inauguró el Centro del Espacio Escultórico, mientras que El Paseo Escultórico nace en 1980. En diciembre de ese mismo año se crean la sala de danza, opera y música Miguel Covarrubias y en enero de 1981 es creado el Centro Universitario de Teatro. En diciembre de 1981 se crean las salas de cine José Revueltas y Julio Bracho.

El CCU ha vivido varios cambios arquitectónicos desde su primera etapa de desarrollo en el año de 1976 hasta principios de los años ochenta, cuando se concluyeron las obras pensadas para terminar el proyecto. Sin embargo después de esta década se han hecho distintas modificaciones en los edificios que corresponden a la librería y cafetería. El cambio más reciente y sumamente notorio es la edificación del Museo Universitario de Arte Contemporáneo (MUAC), hacia finales del año 2008. Actualmente el CCU está integrado por la Sala Nezahualcóyotl, la Biblioteca Nacional, la Hemeroteca Nacional, el Teatro Juan Ruiz de Alarcón, el Foro Sor Juana Inés de la Cruz, el Centro del Espacio Escultórico, el Paseo Escultórico (formado por siete esculturas), la Sala Miguel Covarrubias, la Sala Carlos Chávez, las Oficinas de la Coordinación de Difusión Cultural, el Centro Universitario de Teatro, la Sala José Revueltas, la Sala Julio Bracho, la escultura denominada Las Serpientes del Pedregal, la Librería Julio Torri, la Cafetería Azul y Oro y finalmente el Museo Universitario de Arte Contemporáneo.

Instalaciones del CCU

La descripción de cada una de las instalaciones pertenecientes al CCU no sólo requiere de un conocimiento profundo de las diversas especialidades artísticas, sino que también merece un análisis profundo de su interacción con la arquitectura. Por eso mismo me permito llamar su atención sobre sólo tres elementos de este espacio cultural: el Centro del Espacio Escultórico, el Paseo Escultórico, y finalmente la más reluciente joya del CCU, el Museo Universitario de Arte Contemporáneo.

Centro del Espacio Escultórico

Como parte de la conmemoración del 50 aniversario de la Autonomía Universitaria se hizo la magnífica propuesta y construcción del Centro del Espacio Escultórico en Ciudad Universitaria. Su nombre es una metáfora de este nuevo proyecto de la Universidad. Los escultores Federico Silva, Manuel Felguérez, Helen Escobedo, Mathias Goeritz, Manuel Henández Suárez (Hersua) y Sebastian, quienes participaron de forma colectiva en el diseño del Centro del Espacio Escultórico, se apoyaron en la tradición prehispánica y en la vanguardia artística mexicana para crear la monumentalidad que una obra así demandaba.



Centro del Espacio Escultórico. Foto tomada de Internet.

El catálogo de la UNAM de 1980 se describe el Centro del Espacio Escultórico en los siguientes términos: "El Espacio Escultórico es una superficie del terreno natural del Pedregal libre de toda vegetación y encerrado por una plataforma envolvente de forma circular, que comprende dos niveles: una plataforma de desplante y una serie de módulos geométricos colocados sobre la misma. El diámetro exterior de la plataforma envolvente mide 120 metros y el diámetro interior 92.78 metros, lo que hace un ancho de la plataforma de: 13.61 metros. La plataforma está construida con base en dos muros de piedra volcánica, a junta seca, que contiene un relleno de balastra con objeto de lograr un piedraplén permeable. La altura de estos muros es variable, dada la particular topografía de la zona, que oscila entre 0.50 metros y 9 metros. La superficie de la plataforma está acabada en grano de tezontle planchado, con objeto de mantener la permeabilidad y proporcionar un toque de color. Sobre esta plataforma se levanta una serie de módulos poliédricos, de base rectangular de 9 x 3 metros, con una altura de 4 metros. La disposición de estos módulos es radial y por cuadrantes; en cada cuadrante están dispuestos 16 módulos, separados entre sí por una calle que tiene 1.75 metros sobre el perímetro interior, y 2.67 metros sobre el exterior. De esta forma, toda la plataforma envolvente consta de 64 módulos."

Estos módulos cuentan con cuatro avenidas más anchas que marcan los puntos cardinales. El número de los módulos y su disposición circular puede significar muchas cosas. Mi

significado favorito, inventado por mi, es que representan las 64 combinaciones de nucleótidos en codones que a su vez definen el código genético; estas combinaciones en tiempo y espacio simbolizan las posibilidades del "todo" de la vida. Desafortunadamente es posible que no a muchos les guste o parezca razonable... incluso a mí.

Según Sánchez Macgrégor, "el Espacio Escultórico es un microcosmos que sintetiza el Universo. Puede añadirse que este mandala, símbolo macro y microcósmico, es como una metáfora de la esfera del claustro materno. Su redondez concentra las energías de un mundo de dentro y de fuera, Cosmos y Tierra, una proporción geométrica que vuelve transitable el más allá de las tempestades ígneas. *El mundo es redondo en torno al ser redondo*. Su redondez, además, ayuda a recogerse en uno mismo, afirma nuestro ser íntimamente. Esto es lo que ha motivado que multitud de grupos esotéricos peregrinen, en ciertas fechas auspiciosas (Día de Muertos, verbigracia), al Espacio Escultórico".

Es difícil dar un sentido único a algo sincrético como el Centro del Espacio Escultórico, que es a la vez plaza pública y templo, que es círculo, eterno por definición, y a la vez contenedor de un mar de roca fundida que, en mi opinión, sugiere el origen de todo, convirtiéndolo por esa razón en el "Centro".

Paseo Escultórico

Este paseo se compone de siete esculturas situadas, al igual que el Centro del Espacio Escultórico, en medio de la vegetación nativa del Pedregal. Todas las esculturas se encuentran comunicadas por veredas que permiten visitarlas en un solo trayecto. Son esculturas de gran formato, geométricas, hechas para admirarse por fuera y por dentro. Sus materiales, colores y texturas fueron seleccionadas por los autores para adaptarse a las hondonadas y piedras del terreno, sugiriendo o recordando en algunos casos a la flora y fauna del lugar. En el caso de la escultura titulada "Variante de la llave de Kepler", de Manuel Felguérez (1979), más bien está relacionada con la ciencia, tópico muy asociado a la Universidad. Las siete esculturas están enmarcadas en una escultura monumental llamada "Las serpientes del Pedregal" que semi-circunda el conjunto escultural.

Vecino a la Hemeroteca y Biblioteca Nacionales se encuentra "Tlaloc" de Sebastián (1980), Quizás sea ésta la obra mejor conservada dada su cercanía con los edificios antes mencionados. Desafortunadamente algunas de las esculturas han sido vandalizadas por "grafiteros" inescrupulosos.



"Tlaloc", escultura de Sebastián. Foto: Carmina Montiel.

Más lejana se encuentra la escultura titulada "Ave dos", de Hersúa (1980), realizada en ferrocemento pintado. "Colotl", al igual que "Tlaloc", también fue creada por Sebastián (1980), es una escultura imponente que nos permite transitar a través de ella. Su nombre quiere decir "escorpión". Otro elemento zoomórfico inconfundible es "Coatl", escultura de Helen Escobedo (1980). Su nombre quiere decir "serpiente" en náhuatl. A pesar de estar compuesta de elementos cuadrangulares, su forma y colores decrecientes dan la sensación de deslizamiento sobre un terreno en el que no es difícil imaginar a estos ofidios.



En primer plano, "Colotl" de Sebastián, en segundo plano "Coatl" de Helen Escobedo y al fondo "Las Serpientes del Pedregal". Foto: Carmina Montiel.



En el primer plano, "Ocho conejo" de Federico Silva, al fondo "Corona del Pedregal" de Mathias Goeritz. Foto: Carmina Montiel.

"Ocho conejo", escultura de Federico Silva (1980), es un tributo a la fertilidad como lo sugieren tanto su nombre como sus simbólicos elementos fálicos. Mathias Goeritz contribuyó al paseo con "Corona del Pedregal" (1980). Esta última, muy en el estilo del autor, puede verse como una forma completamente fuera del contexto orgánico si se observa con descuido. Sin embargo es claramente una alegoría de la vegetación correspondiente al terreno semidesértico en el que el paseo escultórico ha sido erigido.

Museo Universitario de Arte Contemporáneo (MUAC)

Como se mencionó anteriormente, el edificio más reciente del CCU es el dedicado al arte contemporáneo, el MUAC. Este museo tiene la consigna de ser el espacio que albergue los giros y necesidades del arte actual y futuro. Debe ofrecer al público una manera novedosa de interactuar con el arte a través de tecnologías emergentes como son luces y sensores electrónicos.

El responsable del diseño del MUAC es el arquitecto mexicano Teodoro González de León, Doctor *honoris causa* por la UNAM, creador edificios consagrados al arte como el Museo Rufino Tamayo, el Museo de sitio en Chichén Itzá y el Conservatorio Nacional de Música.



Explanada del Museo Universitario de Arte Contemporáneo. Foto: Carmina Montiel.

El edificio tiene de muros blancos y dos pisos, es una estructura circular con acabados geométricos. En su interior está organizado en salas de distintos tamaños, interconectadas por tres corredores interiores. En la planta alta están los 14 espacios de exhibición agrupados en cuatro secciones. Los muros pueden adaptarse para ser utilizados de manera aislada o para formar una sola sala mayor. En la planta baja, a la que se accede por un elevador, se encuentran la mediateca, las salas de conferencias, la cafetería, el auditorio y las bodegas. También ahí encontramos los tres espacios educativos del MUAC, llamados "La zona", "La isla" y "El ágora".

Este proyecto arquitectónico incluye el uso de paneles móviles en el techo cuya inclinación puede controlarse para dejar entrar la cantidad de luz deseada en cada espacio y que pueden cerrarse para oscurecer por completo el museo. Sin embargo la iluminación está sujeta al capricho del cielo, de modo que la iluminación de las salas se transforma conforme avanza el día y conforme cambie el sol con el año. El MUAC, a diferencia de los museos tradicionales, permite a las obras que alberga interactuar con el mundo exterior, en forma de luz, tiempo y clima a través de sus vidrios.



Explanada del MUAC con "La Espiga" de Rufino Tamayo en primer plano. Foto: Carmina Montiel.

En resumen, vale la pena hacerse tiempo para visitar el CCU y disfrutar de una obra de teatro, un poco de música, caminar por el Paseo Escultórico, montar sobre la espalda de las Serpientes del Pedregal si se cuenta con calzado cómodo, meditar en el Centro del Espacio Escultórico o simplemente beber café o leer un libro en un espacio inspirado en, y que invita a, la cultura.

Bibliografía

Artigas B. Juan (2006) "Guía de sitios y espacios" UNAM, México.

Celorio Blasco Gonzalo (1992) "Crónica 1989-1992" Coordinación de Difusión Cultural UNAM, México.

Vázquez Aquino Marcela (2009) "Políticas culturales en la UNAM y su aplicación en los recintos del Centro Cultural Universitario: la brecha entre las políticas y las prácticas". Tesis, FCPyS, UNAM.

Universidad Nacional Autónoma de México (1982) "Informe 1981" Dirección General de Estudios Administrativos, UNAM, Tomo I, México.

Documentos en línea

Canseco Rodal Raúl, López Durán Daniel, Martínez Reyes Iván y Trinidad Bacilio Manuel (2007) "Espacio Escultórico de Ciudad Universitaria".
<<http://culturaycomunicacionfi.blogspot.com/2007/11/espacio-escultrico-de-ciudad.html>> [Consulta: 25 de mayo de 2009].

López Córdova Idalia "Ven y conoce el Centro Cultural Universitario"
<<http://www.cultura.unam.mx/index.html?tp=articulo&id=399&ac=mostrar&Itemid=279&ct=309>> [Consulta: 25 de mayo de 2009].

López Zambrano Paula (2009) "MUAC: un museo más o más público para una nueva propuesta museográfica"
<http://www.replica21.com/archivo/articulos/k_1/557_lopezz_muac.html> [Consulta: 27 de mayo de 2009].

Rojas Urrutia Carlos (2008) "Inaugurará la UNAM el Museo de Arte Contemporáneo "
<<http://www.eluniversal.com.mx/notas/557717.html>> [Consulta: 26 de mayo de 2009].

Sánchez Macgrégor Joaquín (2007) "A treinta años del Espacio Escultórico" [en línea]. *Revista de la Universidad de México*. Nueva época. Noviembre 2007, No. 45.
<<http://www.revistadelauniversidad.unam.mx/45/sanchez/45sanchez.html>> [Consulta: 29 de mayo de 2009].



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009).
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

EL EJERCICIO INDUCE ESTRÉS OXIDANTE. REGULACIÓN POR REDOX DE LA CONTRACCIÓN/RELAJACIÓN MUSCULAR

Alicia Ortega, Aldo A. Tirado, Pável Vázquez, Francisco Pérez y Rocío Álvarez
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
aortega@unam.mx

Resumen

El músculo esquelético se caracteriza por su capacidad para contraerse en respuesta a un estímulo nervioso. Está formado por miofibrillas, las cuales son las principales estructuras funcionales de la fibra muscular. La fibra tiene un elaborado sistema de retículo sarcoplásmico (RS), principal almacén de calcio. En las cisternas terminales del RS se localizan los receptores de rianodina (RyR) o canales de calcio, que mediante la despolarización de los túbulos transversos, liberan el calcio al citoplasma, lo que permite la contracción muscular y, en el retículo longitudinal se encuentra la ATPasa de Calcio o SERCA1, la cual remueve el calcio del citosol al interior del RS, dando lugar a la relajación muscular. Durante la contracción y en la actividad muscular prolongada, hay un incremento en el consumo de oxígeno y en la síntesis de Oxido Nítrico que modifican el estado redox citosólico y consecuentemente el estado redox de las cisteínas vecinales de proteínas como SERCA1 y RyR, efecto que está relacionado con la fatiga muscular.

Palabras clave: Músculo, ejercicio, SERCA, fatiga, redox.

Abstract

Muscle has the capacity of contraction in response to a neural stimulus. It is formed by myofibrils, which are the functional structures of a muscle fiber. The fiber has an elaborated membrane system called Sarcoplasmic Reticulum (SR), which is the principal source of calcium. In the SR terminal Cisternae is located the calcium channel (Ryanodyne Receptor (RyR)), which upon a depolarization of transverse tubules, releases calcium to the cytosol to initiate contraction. While in the longitudinal SR is the Ca^{2+} ATPase or SERCA1, which moves cytosolic calcium back to the SR during relaxation. During muscle contraction and prolonged muscle activity there is an increment in oxygen consumption and Nitric Oxide synthesis; which modify the cytosolic redox potential and in consequence the redox state of vicinal cysteins in proteins such as the SERCA1 and RyR, with an effect in muscle fatigue.

Keywords: Muscle, exercise, SERCA, fatigue, redox.

Introducción

Cuando el músculo esquelético se le estimula repetidamente, la fuerza que desarrolla durante cada contracción decae al cabo de varias repeticiones y se vuelve refractario a las estimulaciones siguientes. Este proceso se le conoce como fatiga y es una condición intrínseca de las células musculares, o sea no es determinada por cambios en el sistema nervioso central. La fatiga muscular es un proceso reversible que protege al músculo del daño irreparable. Aunque todo tipo de músculo esquelético experimenta la fatiga, la fibra muscular rápida que es más abundante en los músculos de desplazamiento, posee un metabolismo principalmente glucolítico y es especialmente susceptible a la fatiga, en comparación con la fibra muscular lenta, que es más abundante en los músculos posturales y que tienen un metabolismo oxidativo (Figura 1).

Músculo Esquelético

- Lento:** Músculo rojo
abundantes mitocondrias
metabolismo **aeróbico**
(músculos de la postura)
alta resistencia a la fatiga
- Rápido:** Músculo blanco
pocas mitocondrias
metabolismo **anaeróbico**
(músculos del movimiento)
baja resistencia a la fatiga



Figura 1. Diferencias estructurales y metabólicas entre el músculo lento y el músculo rápido.

El músculo esquelético aislado, estando en condiciones experimentales óptimas para su función y con un sistema amortiguador de pH, presenta una pérdida de tensión reversible después de una estimulación tetánica, entendida esta última como una estimulación sostenida en duración, frecuencia e intensidad. Mientras el músculo rápido pierde tensión en la estimulación tetánica y a lo largo de subsecuentes estimulaciones, el músculo lento mantiene la tensión por tiempos prolongados con las mismas características del estímulo (Figura 2). El mecanismo que lleva a la fatiga ha sido investigado desde hace más de seis décadas sin haberse esclarecido su causa a nivel molecular y los pasos que intervienen en el proceso. Se ha encontrado que algunos de los mecanismos que acoplan la excitación con la contracción (acople de e-c) están alterados durante la fatiga (hipótesis del acople e-c de la fatiga). También se han descrito alteraciones por los productos de la glucólisis y la hidrólisis del ATP por la ATPasa de Ca^{2+} del Retículo Sarcoplásmico (RS) y la ATPasa de la Miosina durante la relajación del músculo, como son el aumento en el ácido láctico y en la concentración de fosfatos (Pi) (hipótesis metabólica de la fatiga). Siendo el potencial redox fundamental para casi cualquier función celular, también se ha propuesto al estrés oxidante como el mecanismo que regula la actividad muscular y la fatiga. Sin embargo, ninguna de las hipótesis por separado explica contundentemente el mecanismo que lleva a la aparición de la fatiga, ni cómo se inicia la recuperación.

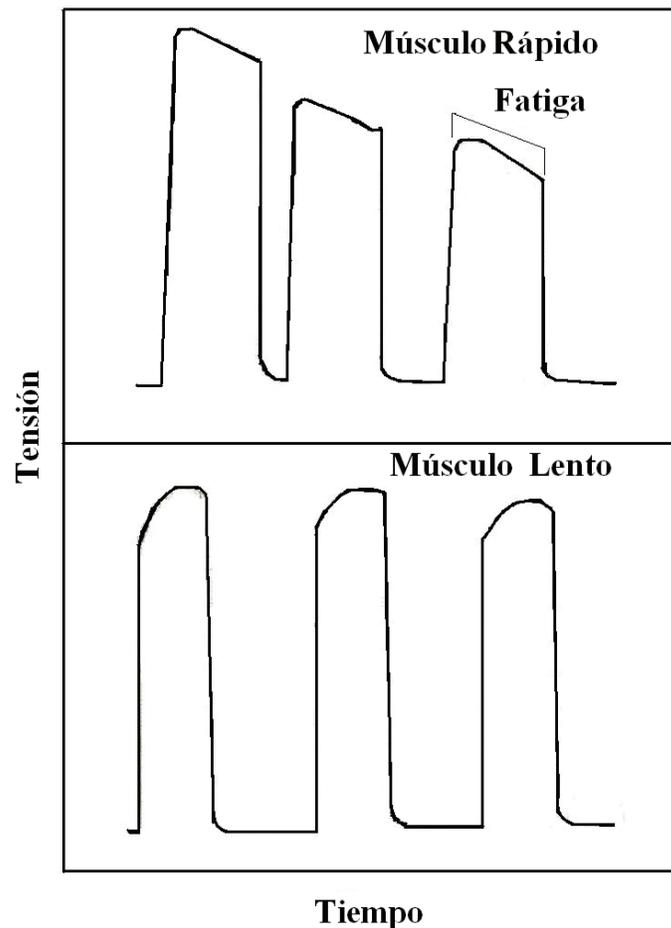


Figura 2. Contracción tetánica A) músculo extensor *digitorum longus* (rápido) y B) músculo Sóleo (lento). La pérdida de la tensión en función al tiempo (fatiga) es evidente en el músculo rápido y no se aprecia en el músculo lento.

La actividad muscular prolongada, está acompañada de un incremento en el consumo de O_2 , lo que genera una cascada de moléculas de muy bajo peso derivadas del O_2 a las que se les conoce como Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). La molécula común en la cascada de ERO es el radical súperóxido. Por otro lado, el Oxido Nítrico (NO) es otra molécula que se encuentra también en baja concentración en el músculo en reposo pero aumenta su síntesis durante periodos de actividad muscular prolongada [1-3]. La formación de otros radicales libres a partir de las moléculas mencionadas anteriormente tienen una alta selectividad para reaccionar con grupos tioles (-SH). La oxidación de las cisteínas (Cys)-SH a través de la S-glutatioilación; S-nitrosilación; formación de ácido sulfénico; ácido sulfínico y formación de sulfenil amida [4], así como también la formación de puentes disulfuro, modifican la función y estructura de las proteínas en general, por lo que la oxidación irreversible de las cisteínas en proteínas claves de la regulación intracelular de calcio en la fibra muscular, no sería un mecanismo compatible con un proceso reversible como lo es la fatiga. Las Cys-SH son altamente susceptibles al ambiente redox de la célula por lo que las Cys-SH vecinales, en el microambiente reducido del citosol, regularían la actividad de una proteína en función de las condiciones redox. Por lo que se sugiere que el estrés oxidante contribuye al desarrollo de la fatiga muscular, a través de su efecto sobre los grupos Cys-SH vecinales de la ATPasa de Ca^{2+} (SERCA1) y de los Canales de Ca^{2+} (Receptores de Rianodina (RyRs)). Por ello se ha propuesto que los grupos tioles vecinales de la SERCA1 y de RyR, tienen una función reguladora sobre la actividad del músculo incluyendo la fatiga [5, 6]. Es importante mencionar que tanto la miosina como la actina, proteínas del aparato contráctil y otras proteínas del citoesqueleto, carecen de grupos tioles vecinales y no son afectadas por cambios en el estado redox.

La SERCA1, conocida también como factor relajante, ya que de ella depende la relajación muscular al transportar calcio del espacio miofibrilar al interior de RS con una estequiometría de dos Ca^{2+} por un ATP hidrolizado, y el canal del Ca^{2+} (RyR), a través del cual sale masivamente el Ca^{2+} almacenado en el RS al espacio miofibrilar para que se lleve a cabo la contracción; son proteínas tioles vecinales (PTV) que están expuestas a cambios de potencial redox en sus diferentes dominios, ya sea la porción expuesta al citosol o la expuesta a la luz del RS (Figura 3); aproximadamente 5% de las proteínas celulares son PTV, esto es, proteínas que regulan su estructura y su actividad de manera reversible dependiente del potencial redox [7].

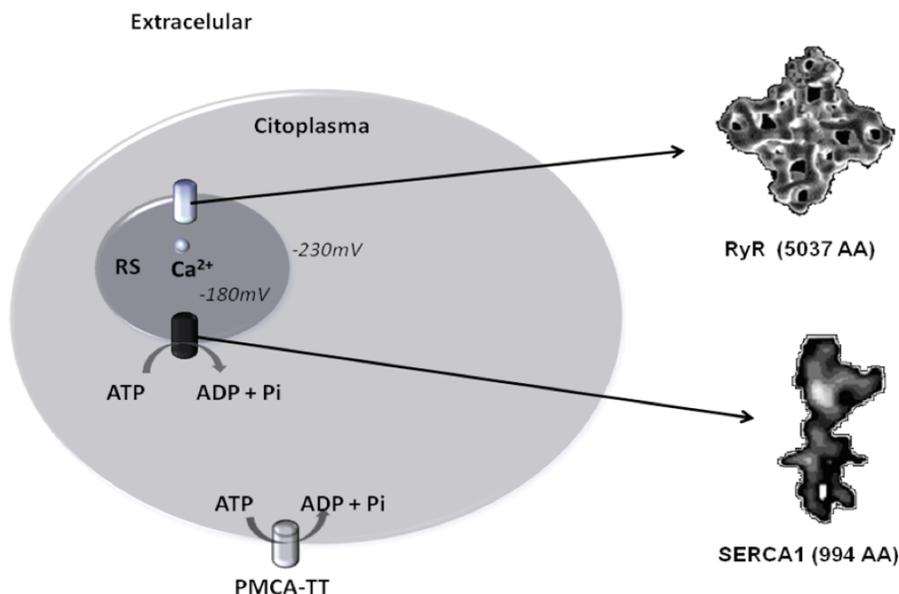


Figura 3. El potencial redox citoplásmico (-230 mV) es más reducido que el potencial redox en el interior del Retículo Sarcoplásmico (-180 mV). Los tioles de la SERCA1 y RyR que se encuentran en la cara citoplásmica del RS, están reducidos [8].

Las proteínas tioles vecinales (PTV) son aquellas que contienen residuos de cisteínas con una proximidad de 2 a 6 aminoácidos (Cys(X)n-Cys) entre ellas en el mismo polipéptido o en cadenas cercanas del mismo o de diferente polipéptido [9]. Esta proximidad entre cisteínas les permite llevar a cabo la formación de puentes disulfuro, los cuales son totalmente reversibles dependiendo del potencial Redox.

Al analizar la secuencia de la SERCA1, se muestra la presencia de 4 pares de cisteínas (Cys³⁴⁴⁻³⁴⁹, Cys⁴¹⁷⁻⁴²⁰, Cys⁶⁷⁰⁻⁶⁷⁴ y Cys⁶⁷⁰⁻⁶⁷⁵), los cuales están a una distancia de 3 – 9 Å entre ellos. Estos grupos tiol vecinal se localizan en la región citosólica de la proteína, están cercanos al residuo de lisina (Lys⁵¹⁵) que es el sitio de pegada del nucleótido (NBS) [10] y al residuo de aspartato (D³⁵¹), sitio de fosforilación (PS) [11]. El sitio de pegada de calcio (CBD) está en la región transmembranal, en donde no se encuentran grupos tiol vecinal. Los residuos de Cys⁸⁷⁶ y Cys⁸⁸⁸ forman un puente disulfuro entre las α-hélice 7 y 8, el cual es necesario para que se lleve a cabo el transporte de calcio hacia el RS [12] La formación de este puente disulfuro se debe a que el potencial redox dentro del RS se encuentra más oxidado que en el citoplasma, donde todos los residuos de cisteína se encuentran reducidos. RyR es un homotetrámero y cada subunidad está compuesta de 5037 aa, con 100 cisteínas por subunidad, de las cuales 15 pares son tioles vecinales y se encuentran en proximidad con sitios reguladores de la actividad del canal [13] (Figura 4).

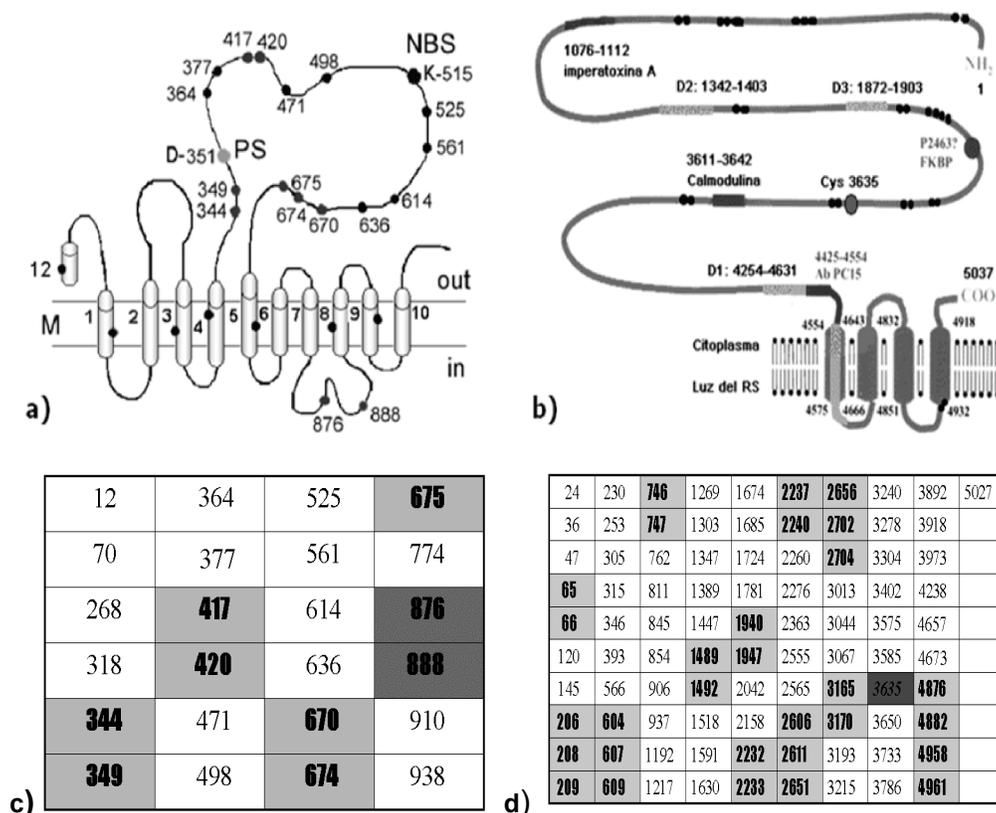


Figura 4. a) Representación esquemática de la SERCA1 (*ATPasa de Calcio del Retículo Sarcoplásmico*) y b) RyR (*receptor de rianodina*). Las tablas c (SERCA1) y d (RyR) muestran la posición de los residuos de cisteína presentes en las secuencias de ambas proteínas.

Adaptación del Músculo Esquelético Rápido al Ejercicio

La actividad muscular prolongada realizada de manera repetitiva por periodos largos de tiempo, lleva a un acondicionamiento del músculo (adaptación) que resulta en la aparición tardía del fenómeno de fatiga. La adaptación al ejercicio es un proceso que involucra a los mecanismos reguladores de Ca^{2+} que permiten mantener las concentraciones intracelulares dentro de los límites que no produzcan aumento de tensión. La actividad de la SERCA1 y de los RyR no se ven directamente afectadas después de un periodo de adaptación al ejercicio [14]. Sin embargo, la ATPasa de Ca^{2+} (PMCA) de los Túbulos Transversos (TT) (invaginaciones de la membrana plasmática), que tiene como función sacar al Ca^{2+} al espacio extracelular [15], se ve importantemente modificada durante el proceso de adaptación, cuando hay un incremento anormal de las concentraciones intracelulares del Ca^{2+} [14]. La Figura 5 muestra la cinética de la PMCA de los TT y de la SERCA1 de RS, obtenida de músculos de animales (conejos Blancos Nueva Zelanda) sin entrenamiento y animales con un protocolo de ejercicio en la banda sin fin, durante 3 meses, 30 min/diarios. En éste periodo, los animales desarrollaron hipertrofia muscular y resistencia a la fatiga. El aislamiento de TT y de RS proveniente de músculo rápido de los animales sin ejercicio y entrenados, permite analizar el efecto del entrenamiento sobre la actividad hidrolítica y el transporte de calcio de la PMCA de los TT y de SERCA1 [14]. El aumento en la actividad de la PMCA de los TT, se debe a un aumento en la expresión de ésta proteína en los TT. En el caso de la SERCA1, aunque no hay un efecto sobre la cinética de hidrólisis de ATP y transporte de calcio, en los animales entrenados, existen cambios conformacionales de la SERCA1 que no tienen un efecto sobre su actividad en las condiciones experimentales en las que fue determinado [14].

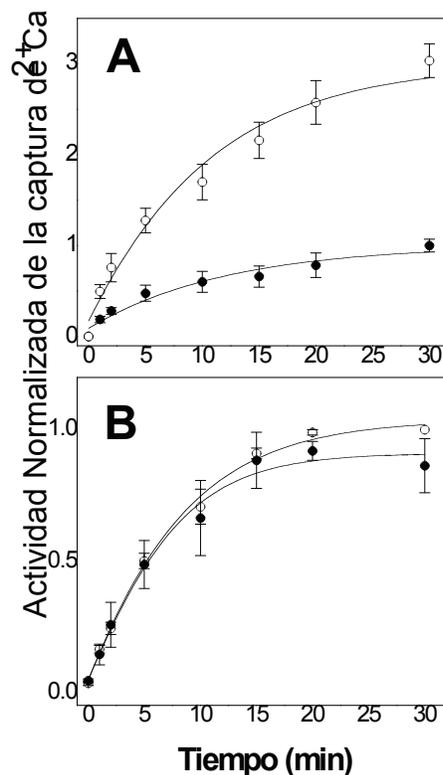


Figura 5. Efecto del entrenamiento al ejercicio sobre la actividad del A) transporte de calcio ATP dependiente en los Túbulos Transversos; B) transporte de calcio ATP dependiente en RS; (●) animales control y (○) animales entrenados. La PMCA tiene un incremento en actividad de 2.7 veces en animales entrenados. No hay efecto sobre la SERCA1 [14].

Efecto de la oxidación de tioles vecinales de la SERCA1 sobre la actividad muscular

La estrategia metodológica para estudiar cambios de estructura y función de SERCA1 y PMCA de TT relacionados con diferentes grados de oxidación de tioles vecinales y la actividad muscular, se realiza con fracciones membranales aisladas de músculos que han desarrollado fatiga. El efecto selectivo del óxido de fenilarsina (PAO) en la oxidación de tioles vecinales y del 2,3 dimercaptopropanol (BAL) que revierte el efecto del PAO sobre las proteínas al desplazar el PAO de los grupos tioles vecinales son usados con el fin de modelar la participación de éstos grupos como mecanismo regulador de la función de las proteínas tioles vecinales durante la fatiga muscular.

En la Figura 6, se muestra el comportamiento del músculo completo inmerso en una solución de Krebs, al cual se le aplica un estímulo tetánico, que lleva a la fatiga y se observa como una pérdida de tensión en función del tiempo. Cuando se incubaba al músculo en presencia de 1mM de PAO, y se estimula con la misma frecuencia, duración e intensidad, se observa una pérdida temprana de la tensión (Figura 6B), sin embargo, cuando se estimula al músculo en presencia de BAL, la fatiga desaparece en los tiempos en los que se observa en el músculo control (Figura 6C).

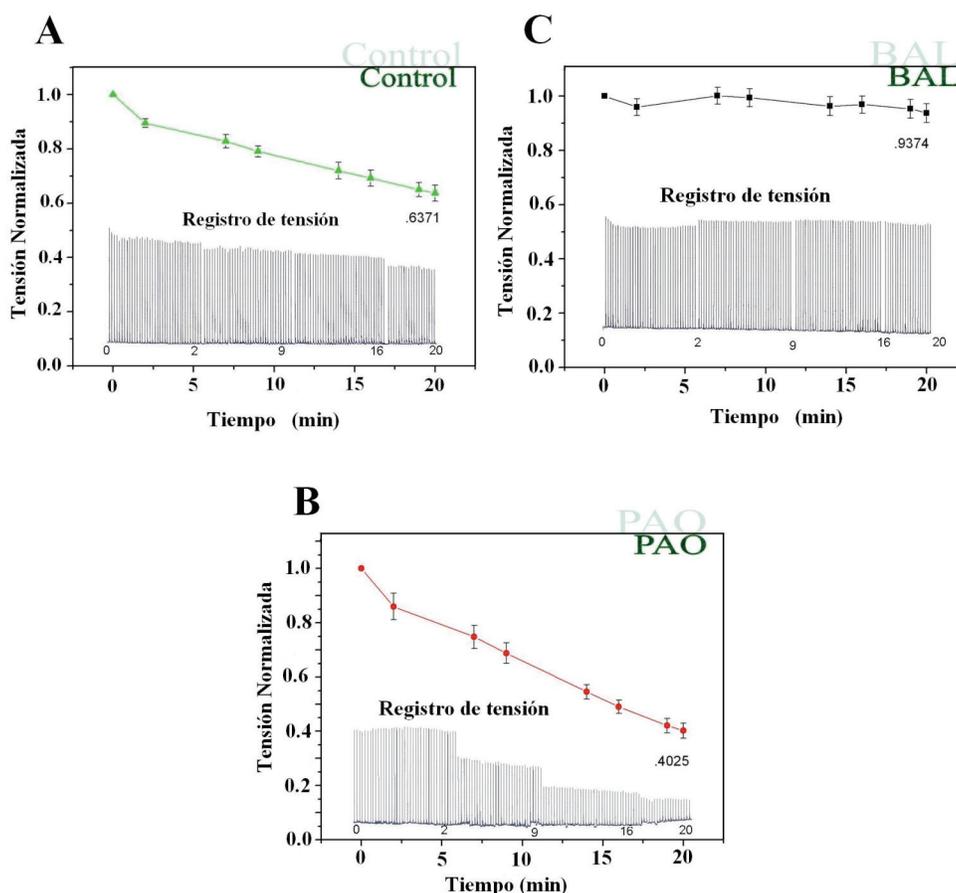


Figura 6. Contracción tetánica del músculo rápido, *extensor digitorum longus* de conejo. A) Efecto de la estimulación tetánica sobre la contractilidad del músculo esquelético. B) Oxidación de las proteínas tioles vecinales sobre la contractilidad del músculo esquelético (estimulación en presencia de PAO). C) Reducción de las proteínas tioles vecinales sobre la contractilidad del músculo esquelético.

En el músculo completo hay un número importante de proteínas tioles vecinales, por lo que indicar que el efecto de la oxidación del PAO es sobre las proteínas del RS, principalmente la SERCA, requiere ser probado, y esto se hace a partir del aislamiento y purificación del RS. En el RS ligero (que corresponde a la fracción del RS que contiene principalmente a la SERCA1), aislado de músculo esquelético rápido, la actividad hidrolítica de ATP de la SERCA1 se inhibe con PAO de manera dosis dependiente como lo podemos ver en la Figura 7A, con una inhibición máxima del 60%. El efecto inhibitorio de 0.1mM de PAO sobre la actividad de la SERCA1 es completamente reversible con 1 mM de BAL [5]. Aunque el BAL *per se* no tiene efecto alguno sobre la actividad de la SERCA1 (Figura 7B), cuando se añade BAL al RS en donde se ha inhibido previamente a la SERCA1 con PAO, la actividad hidrolítica de la SERCA1 se recupera completamente (Figura 7B). Como la hidrólisis de ATP está relacionada con el transporte de calcio, que a su vez está directamente relacionado con la relajación muscular, examinamos el papel que juegan los tioles vecinales sobre el transporte de calcio por la SERCA1. En la figura 7C, se muestra que la captura de Ca^{2+} ATP-dependiente se inhibe 67% en presencia de 0.1 mM de PAO, sin embargo, el BAL no revierte el efecto inhibitorio del PAO en el transporte de Ca^{2+} aun a concentraciones mayores a 10 mM. Esto se debe a que BAL es permeable en las membranas y reduce el puente disulfuro entre las Cys⁸⁷⁶ y Cys⁸⁸⁸ que se encuentran en la luz del RS y que es necesario para el transporte de Ca^{2+} [12]. Es importante considerar que *in vitro*, no existe un mecanismo amortiguador de redox que se regenere, como existe en una célula viva. Por lo que, aunque no haya *in vitro* una reversión de la inhibición del transporte de Ca^{2+} a partir de la oxidación de tioles vecinales, esto no significa que *in vivo* no exista el mecanismo de recuperación del estado redox del RS que depende de transporte de glutatión y restituya el potencial intravesicular del RS [8].

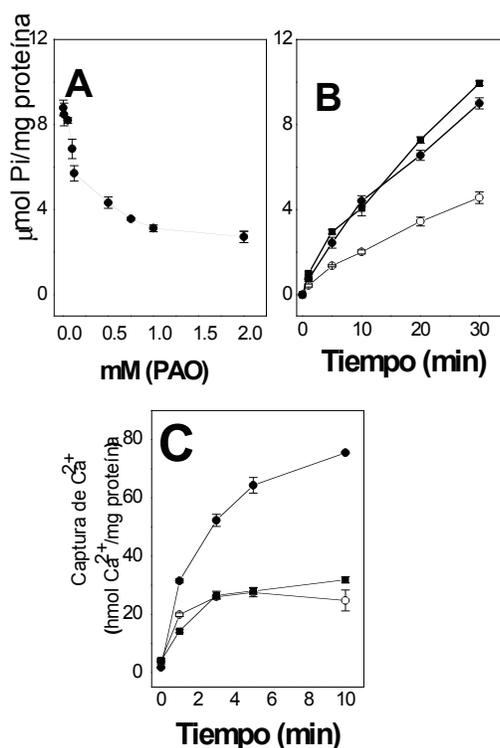


Figura 7. Efecto de PAO y BAL sobre la actividad hidrolítica y transporte de Ca^{2+} de la SERCA1. A) Dependencia de la actividad hidrolítica de SERCA1 en función de la Concentración de PAO. B) Cinética de la hidrólisis de la SERCA en condiciones control (●), en presencia de 0.1 mM PAO (○) y en presencia de 1 mM BAL (■). C) Cinética del transporte de Ca^{2+} en condiciones control (●), en presencia de PAO (○) y en presencia de BAL (■) [5,6].

El efecto inhibitorio del PAO sobre la actividad de la SERCA1 se debe a cambios conformacionales de la proteína. Los cambios conformacionales en las proteínas, pueden ser estudiados a partir de un análisis de su estabilidad térmica y de esta manera analizamos los cambios inducidos en SERCA1 cuando sus grupos tioles vecinales están oxidados. Como se muestra en la Figura 8, un incremento en la temperatura de manera constante llevará a diferentes conformaciones de una misma proteína a través de diferentes estructuras intermedias, al estado desnaturalizado, lo que se verá reflejado en sus temperaturas de transición y probablemente en la entalpía de la transición del estado activo-inactivo, cuando lo que se determina es actividad, o cambios en sus temperaturas de transición del estado nativo-desnaturalizado si lo que determina es su estructura. En la figura 8 se muestran las curvas de inactivación térmica de la SERCA1, después de calentarla a 1°C/min entre los 20 y 60°C. Las curvas de inactivación térmica de la SERCA1 Control (Fig. 8A y D), muestran una temperatura de transición a los 49°C; en presencia de 0.1mM de PAO (Fig. 8B y E) se muestran dos transiciones bien definidas a los 34°C y 27°C; con 1 mM de BAL (Fig. 8C y F). Se observa una sola transición a los 50°C. Como solo la actividad de SERCA1 es la que se mide, las diferentes transiciones, corresponden a diferentes formas activas de la SERCA1.

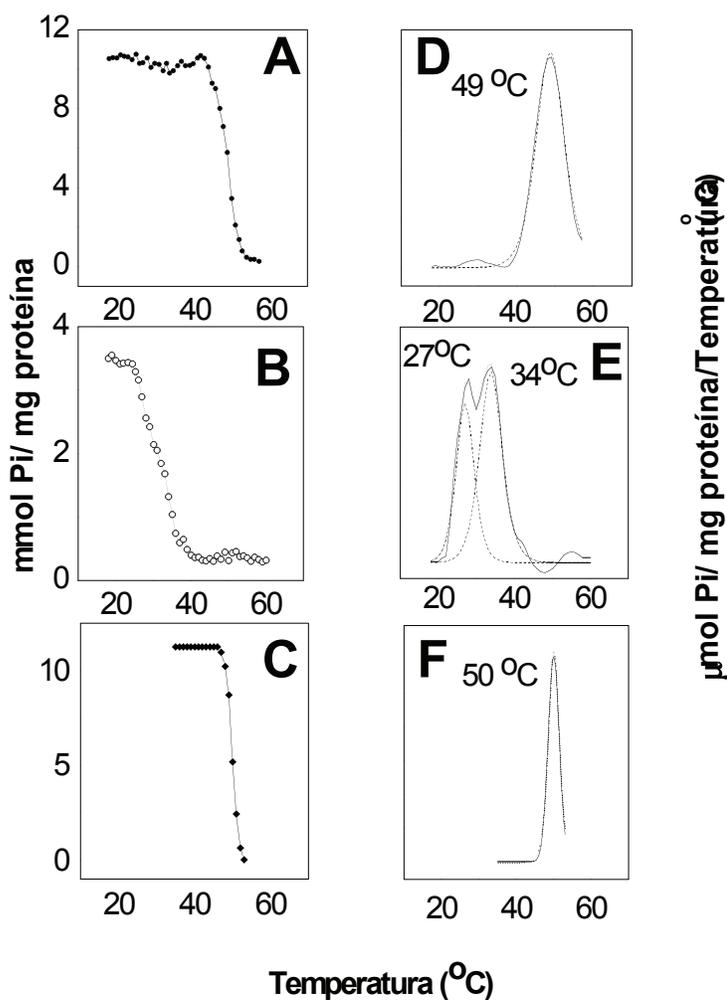


Figura 8. Inactivación térmica de la SERCA1, A) Control (D, primera derivada de A); B) en presencia de PAO (E, primera derivada de B); y C) en presencia de BAL (F, primera derivada de C) [5,6].

Potencial efecto de la fatiga sobre la oxidación de tioles vecinales de la SERCA1

Como lo observamos en la Figura 6, la oxidación de grupos tioles vecinales, potencian a la fatiga en el músculo completo y la presencia del reductor BAL, protege de la aparición de la fatiga. Por lo que el efecto de la fatiga sobre la actividad y estructura de la SERCA1, puede ser estudiado mediante el análisis térmico del perfil de inactivación de la SERCA1 en el músculo fatigado. En la Figura 9, se muestra la pérdida de estabilidad térmica y la aparición de dos transiciones similares de la actividad hidrolítica de la SERCA1, parecida a las observadas cuando los tioles vecinales son oxidados con PAO.

En la Figura 9 se muestra un experimento representativo de la inactivación térmica de la SERCA1 de RS ligero aislado de músculo en reposo con y sin 0.1mM de PAO y en músculo fatigado sin PAO. Desde que se observó que la oxidación de los tioles vecinales de la SERCA por PAO tenía un efecto sobre la conformación de la SERCA1 como se mostró en la Figura 8, comparamos la diferencia en los cambios conformacionales entre la SERCA1 obtenida del RSL aislado de musculo en reposo y después de la fatiga. La inactivación térmica de la SERCA1 de membranas del RS aisladas de músculo en reposo en ausencia de PAO solamente se observa una transición a 49°C. En presencia de 0.1 mM de PAO se observan dos transiciones a 44.8°C y 30.9°C y en membranas aisladas de músculos fatigados hay dos transiciones, a 48°C la segunda transición es a 31°C. Esta segunda transición no se observa en el perfil de inactivación de la SERCA1 de músculos en reposo.

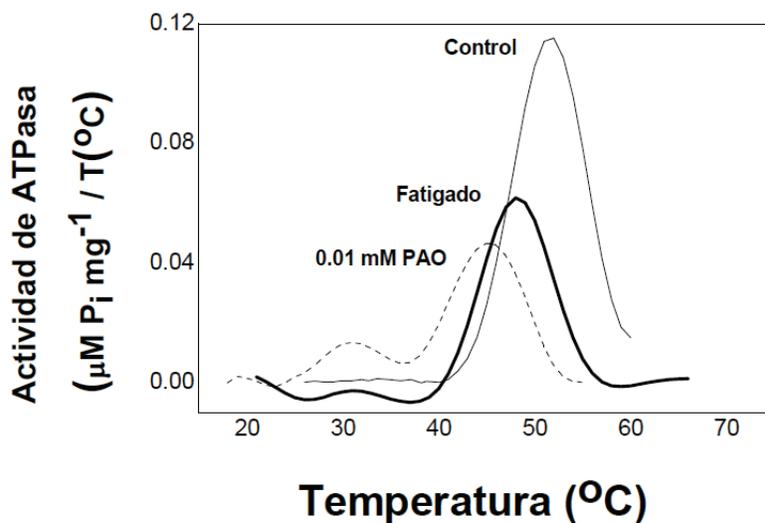


Figura 9. Inactivación térmica de la SERCA1 en RSL Control (línea continua), en presencia de 0.1mM de PAO (línea discontinua) y de músculo fatigado (línea oscura) [5].

Lepock y col. [16] demostraron que el perfil de desnaturalización de la SERCA1 por microcalorimetría diferencial de barrido, estaba representado por dos picos (transiciones endotérmicas) que corresponden a la desnaturalización del sitio de pegada del nucleótido (NBD) en la región citosólica y en el sitio de pegada de Ca^{2+} (CBD) en la región transmembranal de la SERCA1. Basados en la evidencia anterior, se usaron las membranas de RSL para obtener el perfil de desnaturalización de SERCA1 de músculos en reposo, después de la fatiga y de músculos fatigados, en presencia de 1mM de BAL. La Figura 10A muestra el perfil de desnaturalización de la SERCA1 en RSL aislado de músculos en reposo. El principal componente marcado como NBD, corresponde a la desnaturalización del sitio de pegada del nucleótido, con una T_m de 51.5°C. El segundo componente, CBD, corresponde al sitio de

pegada de calcio en la región transmembranal, con una T_m de 63°C. En la Figura 10B se muestra el perfil de desnaturalización de la SERCA1 en RSL aislado de músculos fatigados, en donde se observan además de la transición del NBD a 46.8°C y el CBD a 60.2°C, una tercera transición denominada “dominio indeterminado” (UD), con una T_m a 36.5°C que aparece después de la fatiga. En la figura 10C se muestra el perfil de desnaturalización de la SERCA1 en RSL aislado de músculos en fatigado, en presencia de 1mM de BAL, en ésta condición, la transición UD desaparece, confirmando que el efecto reductor de BAL es sobre los tioles vecinales de la SERCA1.

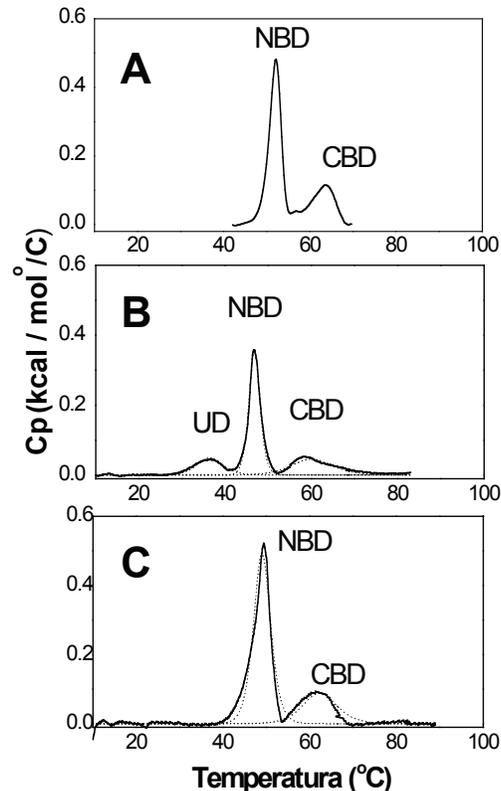


Figura 10. Perfil de desnaturalización de la SERCA1. A) Músculo en reposo; B) Músculo fatigado y C) Músculo fatigado en presencia de BAL [5].

La importancia de los tioles vecinales de la SERCA1 sobre su actividad y cambios conformacionales durante la fatiga

Como lo hemos mencionado, múltiples evidencias fisiológicas indican que la actividad del RS esta inhibida durante la fatiga muscular, resultando en un aumento en la concentración intracelular de calcio, lo que mantiene unidos los puentes cruzados entre la actina y la miosina.

Durante la actividad muscular prolongada hay un incremento en el consumo de oxígeno, y producción de radicales libres que modifiquen el estado redox citosólico lo que sigue que la regulación redox es un mecanismo que controla la actividad muscular incluyendo el estado fisiológico de la fatiga. Por lo que proponemos que el estrés oxidante causado por una actividad muscular prolongada durante el proceso de la fatiga resulta en la inhibición del transporte de calcio por la SERCA1 a través de la oxidación de sus grupos tioles vecinales. La formación de

disulfuros intra-proteicos entre los grupos tioles vecinales cercanos al sitio de fosforilación y al sitio de pegada del nucleótido de la SERCA1 puede deberse a los cambios conformacionales involucrados en la regulación de la contractilidad del músculo esquelético (Figura 11).

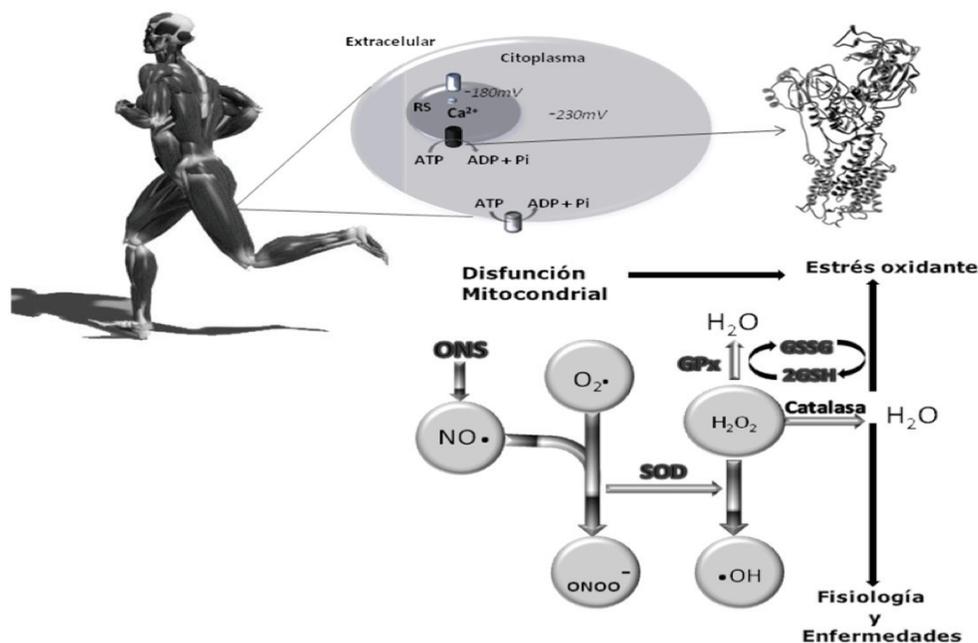


Figura 11. Estrés oxidante sobre la actividad del músculo esquelético rápido.

Referencias

- Allen, D.G., Lamb, G.D. y Westerblad, H. (2008) *Physiol. Rev.* **88**: 237–332.
- Belia, S., Pietrangelo, T., Fulle, S., Menchetti, G., Cecchini, E., Felaco, M., Vecchiet, J. y Fano G (1998) *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**: 865–876.
- Eu, J.P., Hare, J.M., Hess, D.T., Skaf, M., Sun, J., Cardenas-Navina, I., Sun, Q.A., Dewhirst, M., Meissner, G. y Stamler, J.S. (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**:15229– 15234.
- Essig, D.A. y Nosek, T.M. (1997) *Can. J. Appl. Physiol.* **22**: 409–428.
- Álvarez R., Vázquez P., Pérez F., Jiménez A., Tirado A., Irlles C., González-Serratos, H. y Ortega, A. (2008) *J. Muscle Res. Cell Motil.* On line.
- Ortega, A., Alvarez, R., Perez, F., Jiménez, A., Gutierrez, J. y Vazquez P (2004). *J. Muscle Res. Cell Motil.* **25**: 597–598.
- Gitler, C., Mogyoros, M. y Kalef, E. (1994) *Methods Enzymol.* **233**: 403–415.
- Hwang C., Sinskey, A.J. y Lodish, H.F. (1992) *Science* **257**: 1496–1502.
- Gitler, C., Zarmi, B. y Kalef, E. (1997) *Anal. Biochem.* **252**: 48–55.
- Hua, S. e Inesi, G. (1997) *Biophys. J.* **73**: 2149–2155.
- Mcintosh, D.B., Woolley, D.G., Maclennan, D.H., Vilsen, B. y Andersen, J.P. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**: 25227–25236.
- Daiho, T., Yamasaki, K., Saino, T., Kanidochi, M., Satoh, K., Iizuka, H. y Suzuki, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**: 32771–32778.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. y Ogawa, H. (2000) *Nature* **405**: 647–655.
- Becker, V., González-Serratos, H., Álvarez, R., Bäermann, M., Irlles, C. y Ortega, A. (2004) *J. Appl. Physiol.* **97**: 467–474.
- Ortega, A. y Lepock, J.R. (1995) *Biochem. Biophys. Acta* **1233**: 7–13.
- Lepock, J.R., Rodahl, A.M., Zhang, C., Heynen, M.L., Waters, B. y Cheng, K.H. (1990) *Biochemistry* **29**: 681–689.

Semblanza de la Dra. Alicia Ortega



Alicia Ortega Aguilar, nació en la Ciudad de México en 1961, en 1986 obtuvo el grado de Médico Cirujano en la Facultad de Medicina de la UNAM, realizando su internado de pregrado en la Escuela de Medicina de la Universidad de Maryland, en Baltimore, E.U.A durante 1984. En 1991, obtuvo el PhD (Doctorado) en Bioquímica en la Universidad de Waterloo, Canadá, en donde también realizó actividad docente en los Departamentos de Biología y Biofísica de la misma universidad, de 1988 a 1991. Su experiencia como investigador posdoctoral fue en: 1986-1987, en el Departamento de Biofísica y Bioquímica de la Universidad de Maryland, E.U.A, en 1987 se incorpora al grupo de Investigación en Músculo en el Boston Biomedical Research

Institute/Harvard University en donde se le otorga la beca de Investigación de la American Muscular Dystrophy Association. En 1991 es contratada como Investigador posdoctoral Asociado en el Departamento de Química del Massachusetts Institute of Technology (MIT) E.U.A. Recibe la beca de repatriación de científicos mexicanos del CONACyT en 1994 y se incorpora desde entonces al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UNAM en donde hasta la fecha es Profesora de carrera. En el año 2000, fue Becaria de la Fundación Alexander von Humboldt realizando su trabajo de investigación en el Instituto Max-Planck de Bioquímica en Alemania. De 2003 al 2006, fue Jefe del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto Nacional de Perinatología del cual es investigadora honoraria. Actualmente es jefa del laboratorio de Investigación en Músculo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UNAM e imparte clases y es tutora acreditada en los posgrados de Ciencias Biomédicas y de Física Médica del Instituto de Física de la UNAM. Es miembro desde el 2001 de la Academia Mexicana de Ciencias, del Sistema Nacional de Investigadores y de Sistema de Investigación Médica del Sector Salud.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

COMO CONVERTIR A UN INHIBIDOR COMPETITIVO EN INCOMPETITIVO: EL CASO DE LAS BETAÍNAS ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS

Rosario A. Muñoz Clares, Ángel G. Díaz Sánchez, Carmina Montiel
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, CP 04510,
México D. F., México.
clares@servidor.unam.mx

Resumen

*Las betaina aldehído deshidrogenasas (BADHs) son un grupo de aldehído deshidrogenasas capaces de oxidar con diferente eficiencia a la betaina aldehído (BA) en una reacción irreversible que tiene como coenzimas a los nicotinamín adenín dinucleótidos, NAD(P)⁺. Hasta donde se conoce, su mecanismo de reacción y su estructura tridimensional son esencialmente iguales a los descritos para otras aldehído deshidrogenasas (ALDHs). Sin embargo, las propiedades cinéticas de aquellas BADHs que han sido caracterizadas a la fecha presentan diferencias—importantes por sus posibles implicaciones fisiológicas—con las de otras ALDHs. Una de estas diferencias es la inhibición mixta del NADH frente al NAD⁺ encontrada en las BADHs de plantas, bacterianas y animales, mientras que esta inhibición es competitiva en la gran mayoría de las deshidrogenasas dependientes de NAD(P)⁺, incluyendo a las ALDHs. Otra peculiaridad es que se inactivan reversiblemente si se preincuban con el nucleótido reducido o durante el curso de la reacción, inactivación esta última que es más rápida cuanto mayor sea la concentración de sustrato. La estructura tridimensional de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* en complejo con NADPH mostró la formación de un aducto entre la nicotinamida del nucleótido y el grupo tiol de la cisteína catalítica. Pensamos que este aducto, que no ha sido encontrado con anterioridad en ninguna enzima, es la forma inactiva de la PaBADH observada bajo condiciones catalíticas—como el componente incompetitivo de la inhibición y como la inactivación durante la reacción—y no catalíticas. La existencia de dos conformaciones de la Cys catalítica, una que permite que se lleve a cabo la reacción y otra que permite la formación de un aducto no activo con el NAD(P)H, explica el que la inactivación por NAD(P)H ocurra aún a concentraciones saturantes de NAD(P)⁺. Este mecanismo novedoso permite que un inhibidor como el NAD(P)H—que por razones estructurales debería ser exclusivamente competitivo con respecto al NAD(P)⁺—posea un componente incompetitivo en su inhibición, es decir no sólo disminuya la*

afinidad aparente de la enzima por NAD(P)^+ sino que también disminuya la V_{\max} . Tanto el componente incompetitivo como la formación del aducto durante la reacción proveen de válvulas de seguridad que evitan que una alta velocidad de la reacción lleve rápidamente al agotamiento del NAD^+ . "In vivo", la inactivación transitoria de la enzima por cualquiera de estos dos mecanismos permitiría que el NAD^+ consumido en la reacción de la BADH se regenere por las reacciones más lentas que lo reciclan. En el caso de la BADH de plantas ocurre además el establecimiento de una ruta alterna de liberación del NADH cuando la BA está a alta concentración, lo que lleva a que la inhibición por NADH sea parcial y por tanto se evite no sólo el agotamiento del NAD^+ sino también que el aldehído pueda llegar a acumularse y producir efectos tóxicos. En conclusión, ciertas propiedades estructurales de las BADHs les permiten tener mecanismos efectivos de control a corto plazo por el nucleótido reducido, los cuales probablemente también operen en otras ALDHs que los requieran.

Palabras clave: Inhibición competitiva versus incompetitiva; bases estructurales de la inhibición por NAD(P)H ; inactivación por NAD(P)H ; aducto tiol-nicotinamida; consecuencias fisiológicas de la regulación por NAD(P)H .

Abstract

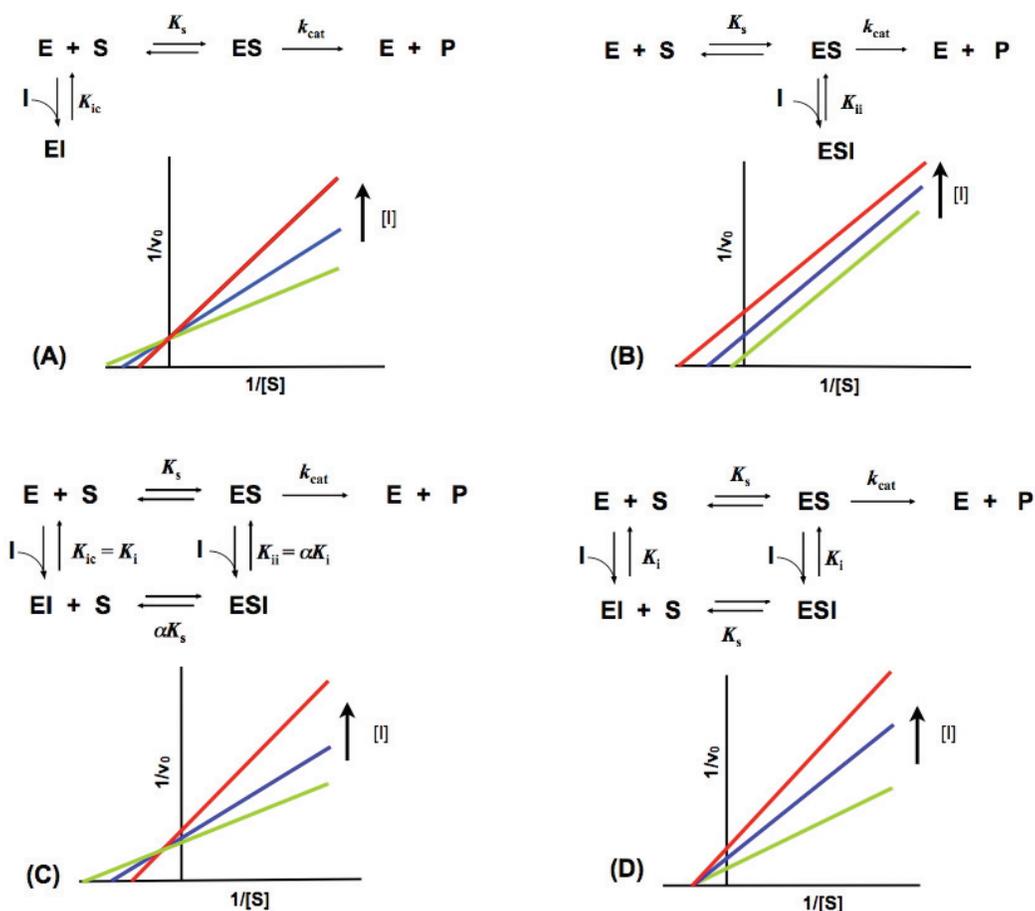
The betaine aldehyde dehydrogenases (BADHs) are a group of aldehyde dehydrogenases able of oxidizing betaine aldehyde (BA) with different efficiency in an irreversible reaction that uses nicotinamide adenine dinucleotides, NAD(P)^+ , as coenzymes. As far as it is known, their reaction mechanism and three-dimensional structure are essentially the same as those described for other aldehyde dehydrogenases (ALDHs). However, the kinetic properties of the BADHs so far characterized present several differences—which may be physiologically relevant—with respect to other ALDHs. One of these differences is the mixed inhibition of NADH against NAD^+ found in the BADHs from plants, bacteria and animals, while this inhibition is competitive in the majority of the NAD(P)^+ -dependent dehydrogenases, including the ALDHs. Another peculiarity is their reversible inactivation after being pre-incubated with the reduced nucleotide, or during the course of the reaction, the latter being faster as the concentration of substrates increases. The *Pseudomonas aeruginosa* BADH three-dimensional structure in complex with NADPH showed the formation of an adduct between the nicotinamide of the nucleotide and the thiol group of the catalytic cysteine. We propose that this adduct—which so far has not been detected in any other enzyme—is the PaBADH inactive form observed under catalytic and non-catalytic conditions. The existence of two conformations of the catalytic cysteine, one that allows the reaction and another that allows the formation of the inactive NAD(P)H -adduct, explains that inactivation by NAD(P)H takes place even at saturating NAD(P)^+ concentrations. This novel mechanism adds an uncompetitive component in the inhibition of NAD(P)H against NAD(P)^+ , an inhibition that should be strictly competitive for structural reasons. In other words, NAD(P)H not only decreases the apparent affinity of the enzyme for NAD(P)^+ but also decreases V_{\max} . Both the uncompetitive component of the inhibition and the enzyme inactivation during the reaction provides the enzyme with a security valve that prevents the exhaustion of NAD(P)^+ when the reaction velocity is high. "In vivo" the transitory inhibition of the enzyme for any of these two mechanisms would allow the recycling of the NAD(P)^+ consumed during the BADH reaction. In the case of the chloroplasmic BADH, a new route of NADH release is established at high concentrations of BA. As a consequence, the inhibition by the reduced nucleotide is partial, and thus not only the exhaustion is prevented of NAD^+ but also the build up of the toxic betaine aldehyde. In conclusion, our results show that certain structural features of the BADHs are the base for effective short-term regulation mechanisms, which are likely shared by other ALDHs that needs them.

Keywords: Competitive versus uncompetitive inhibition; structural bases for NAD(P)H inhibition; enzyme inactivation by NAD(P)H; thiol-nicotinamide adduct; physiological implications of the regulation by NAD(P)H.

Diferentes tipos de inhibición y sus implicaciones fisiológicas

La inhibición enzimática juega un papel fundamental en la regulación de los flujos metabólicos, por lo que es de gran importancia el conocer los efectos que sobre estos flujos tienen los diferentes tipos de inhibidores. Atendiendo a la especie de la enzima a la que se unen, en las reacciones monosustrato los inhibidores se clasifican en competitivos, incompetitivos y mixtos [1]. Los inhibidores competitivos se unen a la enzima libre (E) en competencia con el sustrato y por tanto el sustrato y el inhibidor no pueden estar unidos simultáneamente a la enzima (Esquema 1A). Esta inhibición puede eliminarse a altas concentración de sustrato relativas a su K_m y a la concentración efectiva de inhibidor presente (es decir, a la concentración de inhibidor relativa a su K_i). Los inhibidores incompetitivos se unen a la especie de la enzima que ya tiene unido el sustrato (ES) (Esquema 1B), por lo que producen mayor inhibición a mayor concentración de sustrato y su máxima inhibición a saturación de éste. Los inhibidores mixtos se unen a ambas formas de la enzima y presentan por tanto dos componentes de inhibición: el competitivo y el incompetitivo (Esquema 1C). Un tipo especial, y no muy frecuente, de la inhibición mixta es la inhibición nocompetitiva (Esquema 1D), que se caracteriza porque el inhibidor posee igual afinidad por la enzima libre que por la enzima que ya ha unido al sustrato.

Los inhibidores incompetitivos, o los mixtos que poseen un componente incompetitivo por muy pequeño que éste sea, son mucho más efectivos que los inhibidores competitivos en disminuir el flujo a través de la ruta metabólica en la que se encuentre la enzima inhibida. Esto es porque—a diferencia de la inhibición competitiva—el efecto de la inhibición incompetitiva no es contrarrestado por la acumulación de sustrato que sigue inevitablemente a la inhibición de una enzima. Por el contrario, se favorece a medida que transcurre el tiempo, ya que el sustrato de la reacción inhibida va acumulándose progresivamente al seguir siendo producido por la reacción anterior y no consumido en la reacción de la que es sustrato. Como discute Cornish-Bowden [2], la inhibición incompetitiva puede llevar a que no se pueda establecer la condición de estado estacionario—necesaria para cualquier ruta metabólica—y con ello a la muerte celular. Es por esto que los organismos vivos parecen no usar inhibidores “sin salida” incompetitivos o mixtos como medio de control metabólico. En reacciones con dos sustratos o más que operan bajo la condición de estado estacionario es frecuente que se dé una inhibición incompetitiva de algún producto con respecto a alguno de los sustratos, pero estos productos, a diferencia de los inhibidores “sin salida”, son sustratos de la reacción siguiente en la ruta metabólica y eso controla su concentración dentro de los límites impuestos por el flujo en estado estacionario de esta vía.



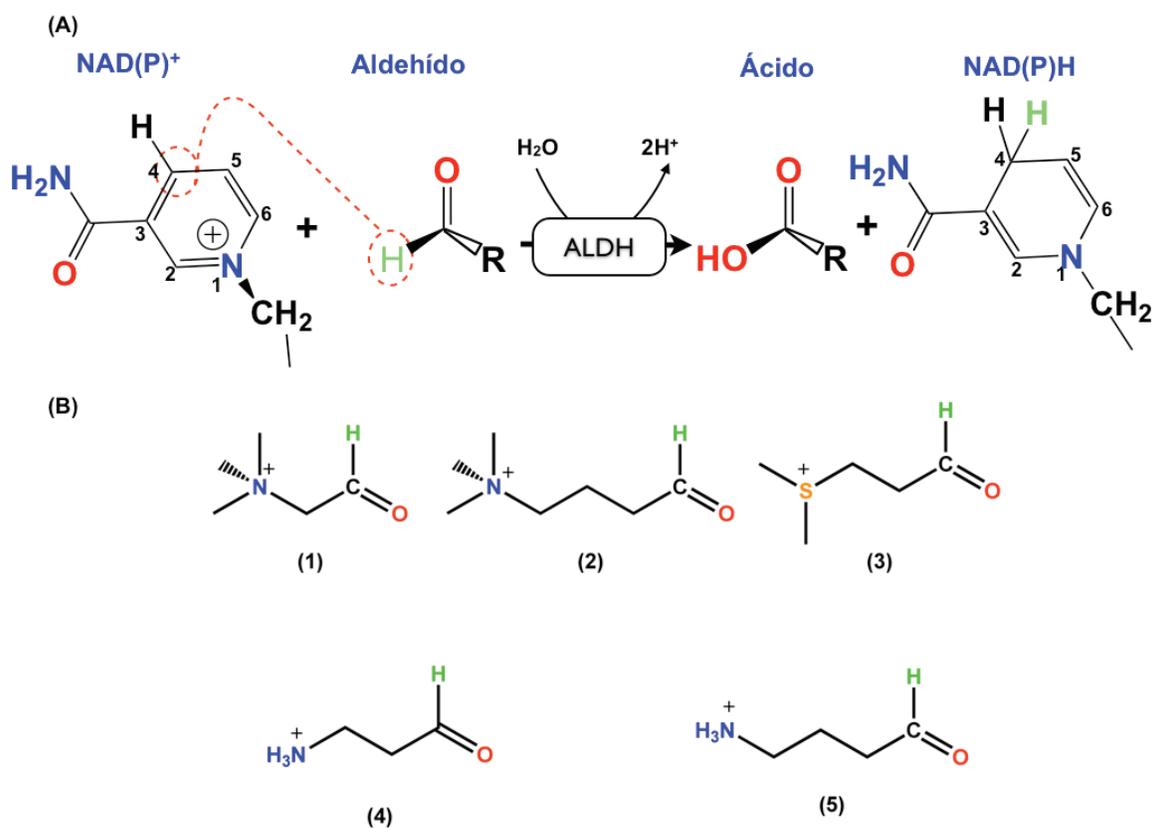
Esquema 1. Tipos de inhibición. Formas de la enzima que unen al inhibidor en reacciones monosustrato y patrones de inhibición mostrados en gráficas de dobles recíprocos. Inhibición competitiva (A). Inhibición incompetitiva (B). Inhibición mixta (C). Inhibición no competitiva (D). E = enzima libre; ES = complejo enzima-sustrato. EI = complejo enzima-inhibidor. ESI = complejo enzima-sustrato-inhibidor. K_s = constante de disociación del sustrato del complejo ES; αK_{is} = constante de disociación del sustrato del complejo ESI; K_{ic} = constante de disociación del inhibidor del complejo EI; K_{ii} = constante de disociación del inhibidor del complejo ESI.

Las betaína aldehído deshidrogenasas

Las betaína aldehído deshidrogenasas (BADHs) son enzimas capaces de oxidar con diferente eficiencia a la betaína aldehído (BA) en una reacción irreversible que usa como coenzimas a los nicotinamín adenín dinucleótidos, NAD(P)⁺ [3-9] (Esquema 2A). Dentro de la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas existen varias familias de enzimas entre las que destacan, por poseer un mayor número de miembros caracterizados bioquímicamente, las ALDH9 bacterianas y animales, las ALDH10 de plantas y las ALDH22 bacterianas [10].

Las BADHs no constituyen un grupo homogéneo en lo que respecta a su estado de oligomerización, distribución subcelular y especificidad de coenzima y sustrato [10]. Debido a que históricamente su actividad se midió con diferentes sustratos (Esquema 2B), en el sistema de clasificación de enzimas se les han asignado diferentes números: EC 1.2.1.8 (betaína

aldehído deshidrogenasa); EC 1.2.1.5 (E3 ALDH); EC 1.2.1.19 (γ -aminobutiraldehído deshidrogenasa) y EC 1.2.1.47 (4-*N*-trimetilaminobutiraldehído deshidrogenasa). En general esto refleja además sus diferentes preferencias por un sustrato, y en consecuencia sus diferentes papeles fisiológicos que dependen de su origen o distribución intracelular. Hasta la fecha se ha encontrado que las BADHs participan en: (1) la síntesis del osmoprotector glicina betaína (GB) [6,11-13]; (2) la degradación de colina—por las bacterias que pueden crecer en este compuesto como única fuente de carbono, nitrógeno y energía [4,14-15]; (3) la degradación de poliaminas [16]; (4) la síntesis del ácido γ -amino butírico [17] y (5) la síntesis de carnitina [18]. En nuestro grupo de trabajo estamos estudiando las propiedades cinéticas y estructurales de las BADHs de cloroplasto (chBADH) de amaranto y espinaca [12,19-27], como ejemplos de las enzimas anabólicas que sintetizan glicina betaína, y de la BADH del patógeno humano oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) [20,28-33], como ejemplo de las enzimas catabólicas.



Esquema 2. Reacción catalizada por la BADHs y sustratos conocidos de estas enzimas. (A) El hidruro del aldehído se transfiere al C4 del NAD(P)⁺ en una reacción irreversible que produce el ácido correspondiente y el NAD(P)H. (B) Las enzimas hasta ahora caracterizadas bioquímicamente aceptan a compuestos aldehídos con una carga positiva, ya sea ésta en un nitrógeno cuaternario: betaína aldehído (1) o trimetilamino butiraldehído (2); un azufre ternario: dimetilsulfonio propionaldehído (3); o en un grupo amino: 3 amino propionaldehído (4) y γ -amino butiraldehído (5).

Las chBADHs son enzimas diméricas [5,7] que usan exclusivamente al NAD⁺ [5,7] y participan en la respuesta al estrés osmótico—producido éste ya sea por déficit de agua (sequía) o por exposición a suelos hipersalinos—que consiste en la síntesis y acumulación de glicina betaína en los cloroplastos. Las plantas que poseen esta capacidad de respuesta son mucho más resistentes a estas condiciones adversas que aquellas plantas que no acumulan glicina

betaína. Es por esto que desde hace unos años han habido numerosos intentos de ingeniería metabólica para convertir plantas no acumuladoras de glicina betaína en plantas acumuladoras, transformándolas con genes de BADH de origen bacteriano [34,35] o vegetal [36-39]. Sin embargo, no se ha logrado que las plantas transformadas acumulen el osmoprotector hasta los niveles que lo hacen las plantas que lo producen naturalmente. Estos fracasos pudieran deberse, entre otras razones, a que las enzimas que se introdujeron no posean las características cinéticas adecuadas para llevar a cabo la síntesis de glicina betaína en cantidades tales que permitan su acumulación. De aquí el interés de conocer las propiedades cinéticas de la chBADH que poseen las plantas acumuladoras de GB y las implicaciones fisiológicas de estas propiedades.

En cuanto a la PaBADH, ésta es una enzima tetramérica [21] que cataliza un paso intermedio del catabolismo de colina o de los precursores de colina—acetilcolina, fosfatidilcolina o fosforilcolina, todos ellos compuestos muy abundantes en los sitios que infecta la bacteria. Al mismo tiempo, provee a la bacteria del osmoprotector glicina betaína, importante para resistir el estrés osmótico existente en los tejidos infectados, y de equivalentes de reducción tanto para el catabolismo (NADH) como para el anabolismo (NADPH), ya que ésta—al igual que la enzima de otras bacterias con capacidad de crecer en colina [14,40]—es la única ALDH conocida que usa con igual eficiencia al NAD^+ y al NADP^+ . El NADPH producido en la reacción de la PaBADH puede también ser necesario para la respuesta de la bacteria al estrés oxidativo, que le impone el organismo infectado como una primera línea de defensa frente a la infección. Debido a las importantes funciones de esta enzima en la fisiopatología de la bacteria, pensamos que la PaBADH puede ser un enzima clave en el establecimiento y crecimiento del patógeno y un blanco potencial de fármacos. Su inhibición, además, llevaría a la acumulación de BA que es un compuesto altamente tóxico para la bacteria [41]. El diseño o selección de inhibidores específicos de la PaBADH que puedan usarse como agentes antibacterianos en la lucha contra *P. aeruginosa*—un patógeno altamente resistente hacia los antibióticos de uso común—requiere de una caracterización cinética y estructural a fondo de esta enzima.

Las peculiares propiedades cinéticas de las betaína aldehído deshidrogenasas de cloroplasto y de *P. aeruginosa*

Hasta donde se conoce, la estructura tridimensional [42, 43] (Fig. 1) y el mecanismo de reacción [15] (Esquema 3) de las BADHs son esencialmente iguales a los descritos para el resto de las aldehído deshidrogenasas no fosforilantes (ALDHs) [44]. Sin embargo, las propiedades cinéticas de aquellas pocas BADHs que han sido caracterizadas a la fecha [19, 27, 33, 40] presentan diferencias—importantes por sus posibles implicaciones fisiológicas—con las encontradas en otras ALDHs. El mecanismo cinético de las chBADH [27], PaBADH [33] y BADH de riñón de cerdo [19] es el bi bi secuencial ordenado en estado estacionario característico de las deshidrogenasas dependientes de NAD(P)^+ incluyendo a las ALDHs [45], con el nucleótido oxidado como el primer sustrato y el nucleótido reducido como el último producto. Sin embargo, las BADHs presentan inhibición mixta del NAD(P)H frente al NAD(P)^+ (Fig. 2A), mientras que en el resto de las ALDHs [45], y en la generalidad de las deshidrogenasas dependientes de NAD(P)^+ [45-48], esta inhibición es competitiva. El hallazgo del componente incompetitivo de la inhibición por el nucleótido reducido, que no puede eliminarse a saturación del nucleótido oxidado, llevó a la propuesta de que el mecanismo cinético ordenado de las BADHs era de naturaleza Iso, como define Cleland [49]. En este tipo de mecanismos el último producto liberado de la enzima se une a una forma de ésta diferente a la que une al primer sustrato de la reacción. En el caso de las BADHs, el nucleótido oxidado y el reducido se unirían a formas diferentes de la enzima que estarían en equilibrio (Fig. 2B).

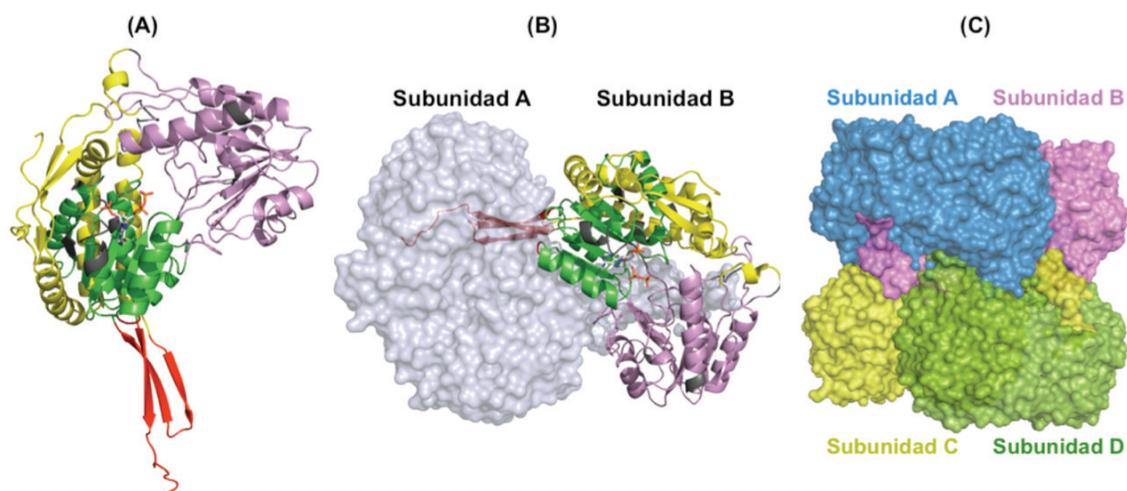
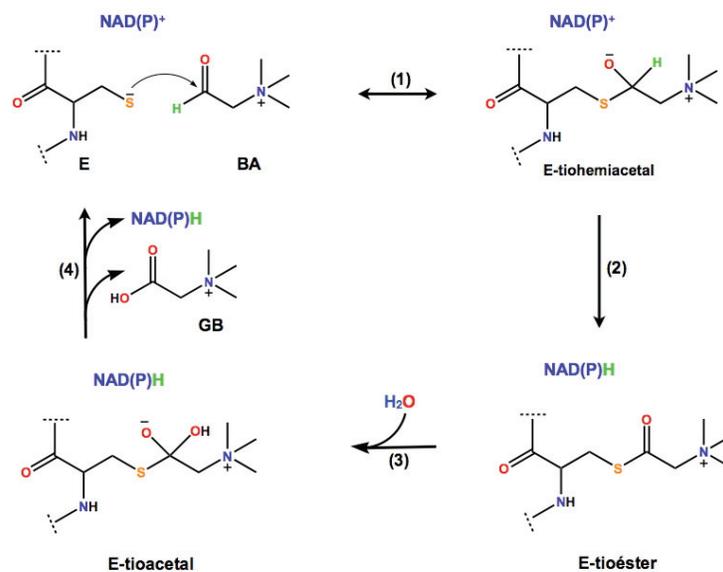


Figura 1. Estructura tridimensional de la PaBADH. (A) monómero, mostrando el dominio de unión al nucleótido (verde), el dominio catalítico (violeta) y el dominio de oligomerización (rojo). (B) Dímero, mostrando la forma en que se asocian dos subunidades por medio de sus dominios de oligomerización. (C) Tetrámero, que es la unidad funcional de esta enzima. La figura se hizo con PyMOL [67] usando las coordenadas cristalográficas del 2ve5.pdb [43].



Esquema 3. Mecanismo químico de la reacción catalizada por las BADHs. Paso (1) *Acilación*: Después de que se han unido el NAD(P)^+ y la betaína aldehído (BA) al sitio activo de la enzima, ocurre un ataque nucleofílico del grupo tiolato de la cisteína catalítica sobre el carbono carbonílico del aldehído, formándose un intermediario tetraédrico covalente (tiohemiacetal). (2) *Transferencia del hidruro*: en este paso se produce la oxidación del sustrato por la transferencia del hidruro del tiohemiacetal al C4 del NAD(P)^+ , formándose un intermediario tetraédrico trigonal (tioéster). (3) *Desacilación*: una molécula de agua realiza un ataque nucleofílico sobre el tioéster formando un nuevo intermediario tetrahédrico (tioacetal). (4) *Liberación de los productos*: La ruptura del enlace S-C permite la liberación de la glicina betaína (GB) seguida de la del NAD(P)H .

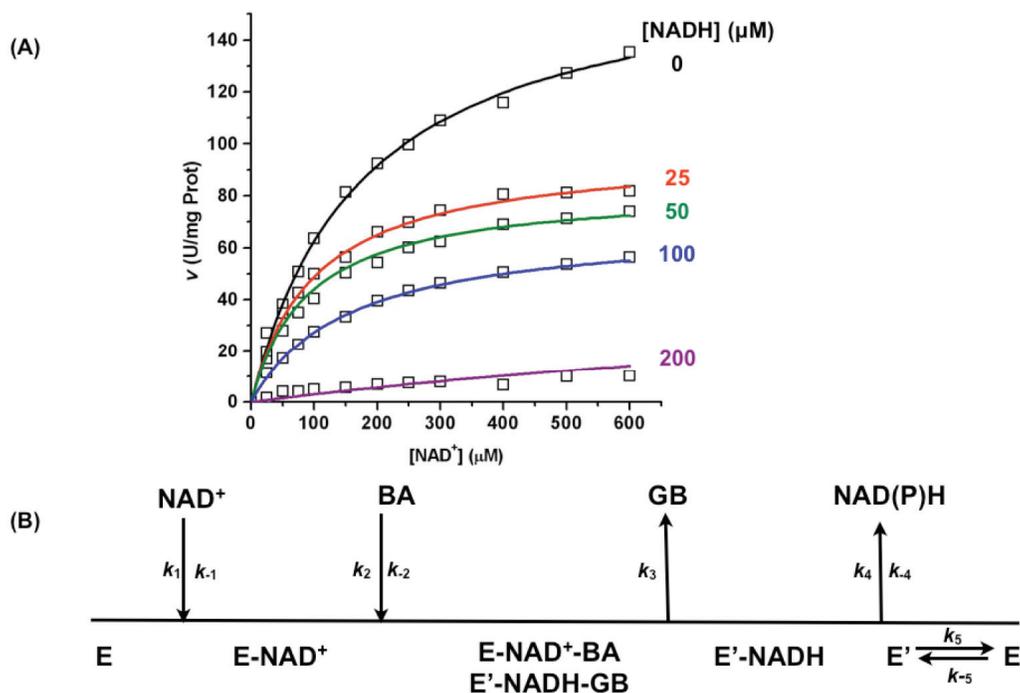


Figura 2. Inhibición mixta del NADH frente al NAD⁺ en las BADHs. (A) Patrón de inhibición obtenido con la PaBADH. (B) Esquema del mecanismo Iso Bi Bi ordenado en estado estacionario propuesto para las BADHs de cloroplasto [27] y de riñón [19]. La forma de la enzima libre que resulta después de liberarse el nucleótido reducido (E') se isomeriza a la forma de la enzima libre que une al nucleótido oxidado (E) antes de que empiece un nuevo ciclo catalítico.

Otra peculiaridad interesante de la cinética de las BADHs bacteriana y de plantas estudiadas en nuestro grupo de investigación es que se inactivan reversiblemente si se preincuban con el nucleótido reducido bajo condiciones no catalíticas, es decir en ausencia de los sustratos NAD⁺ y BA. La inactivación es un proceso dependiente del tiempo y de la concentración del nucleótido (Fig. 3A). Con una cinética de inactivación bifásica en la que primera fase es muy rápida (Fig. 3B). La inactivación es un proceso adicional a la inhibición que éstos nucleótidos producen (Fig. 3C). La enzima de cloroplasto también se inactiva parcial y reversiblemente si se preincuba con BA bajo condiciones no catalíticas, es decir en ausencia de NAD⁺ [C. Mújica-Jiménez, A.G. Díaz-Sánchez, C. Montiel y R.A. Muñoz-Clares, resultados no publicados]. La cinética de estos procesos de inactivación es consistente con un cambio conformacional de la enzima con una modificación química de ésta inducida por el nucleótido o por la BA, que ocurre en forma más lenta que la unión rápida del ligando al sitio activo.

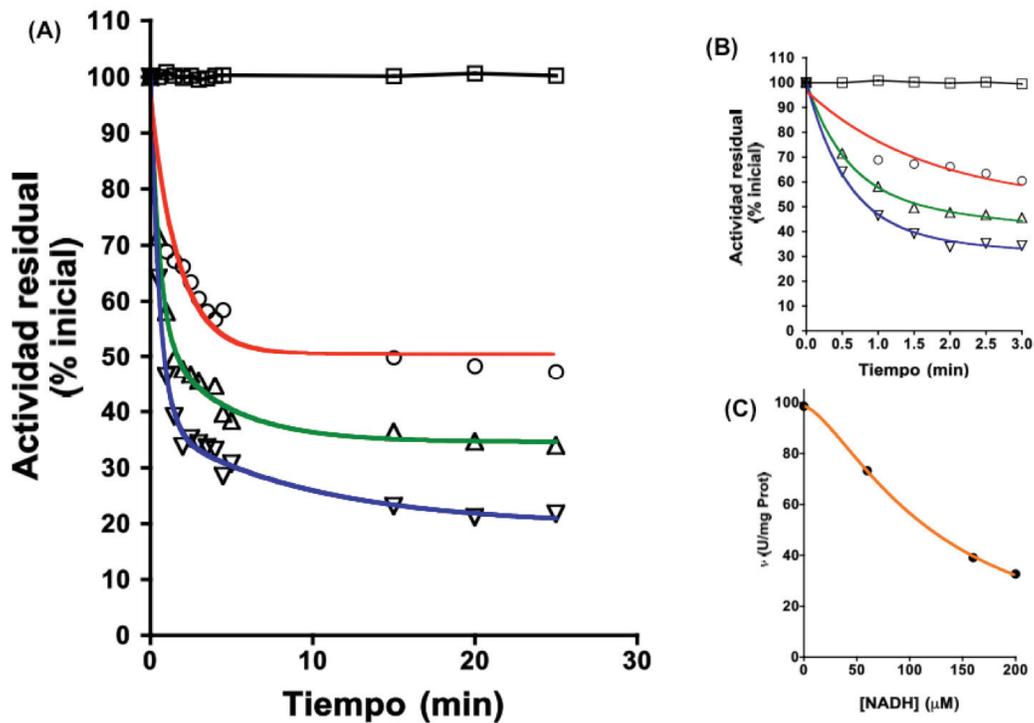


Figura 3. Inactivación de la PaBADH por incubación con NADPH. (A) Cinética bifásica de inactivación observada por la preincubación de la enzima en presencia de NADPH a 60 (○), 120 (△) y 200 μM (▽). (B) Fase rápida de la inactivación observada a los tiempos cortos. (C) Inhibición por el NADH determinada como la actividad al tiempo cero de incubación en presencia de las concentraciones del nucleótido indicadas. Este valor es el considerado como 100% en la gráfica de la inactivación. Las determinaciones de actividad se hicieron en presencia de la misma concentración de NADPH que se usó en la preincubación. Las líneas son teóricas, resultado del mejor ajuste a una doble exponencial (A y B) o a una hipérbola (C).

Y finalmente, pero igualmente interesante, las BADHs estudiadas por nosotros se inactivan rápidamente durante el curso de la reacción por el NAD(P)H producido en ésta (Fig. 4A) [A.G. Díaz-Sánchez, C. Montiel y R.A. Muñoz-Clares, resultados no publicados]. A concentraciones de NAD(P)⁺ cercanas a la saturación sólo se consume aproximadamente un 10% del sustrato. El que no se trata de una inhibición total por el NAD(P)H producido en la reacción se demuestra porque (1) La adición de NAD(P)⁺ y/o BA frescos al medio de reacción una vez que la enzima se ha inactivado no permite que se reinicie la actividad (Fig. 4A) y (2) la concentración del nucleótido reducido no es capaz de inhibir totalmente a la enzima, si se añade al inicio de una reacción que se lleva a cabo con concentraciones de sustratos iguales a las que quedan cuando la reacción se detiene (Fig. 4B). La inactivación, sin embargo, se debe al NAD(P)H formado durante la reacción, puesto que se puede revertir si se elimina éste por dilución en un medio de ensayo fresco, llegándose de nuevo a una segunda inactivación cuando se alcanza una concentración de nucleótido reducido similar a la alcanzada en la primera reacción (Fig. 4C). El grado de avance de la reacción, es decir el porcentaje del sustrato que se consume antes de que se produzca la inactivación, es menor cuanto más altas sean las concentraciones iniciales de cualquiera de los dos sustratos (Fig. 4D). El que el grado de avance de la reacción dependa en forma hiperbólica pero inversa de la concentración de los sustratos es consistente con que esta inactivación sea el resultado de una reacción colateral que convierte a un intermediario del ciclo catalítico, E-NAD(P)H, en un complejo abortivo, E*-NAD(P)H (Esquema

4). La enzima atrapada en la especie E^* -NAD(P)H sólo puede reincorporarse al ciclo catalítico por disociación del NAD(P)H, el cual de acuerdo a nuestros resultados no puede ser desplazado de este complejo ni por $NAD(P)^+$ ni por BA. Este mecanismo difiere del mecanismo Iso propuesto anteriormente en que las especies E^* -NAD(P)H y E^* no forman parte del ciclo catalítico.

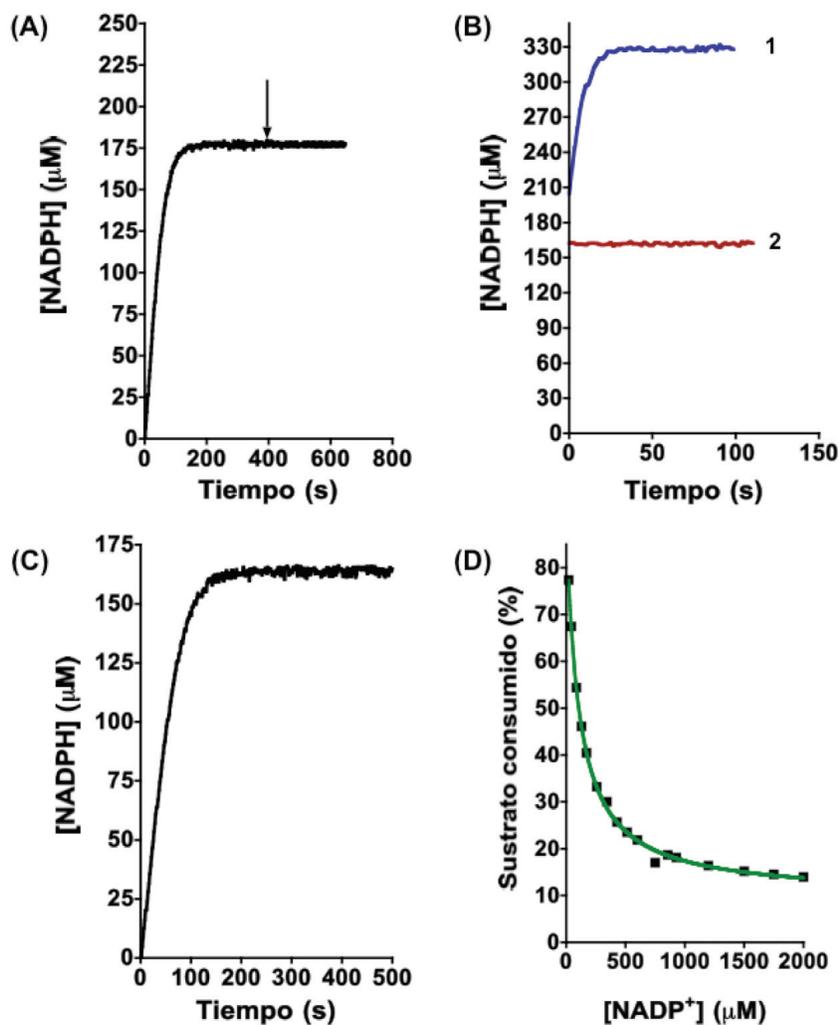
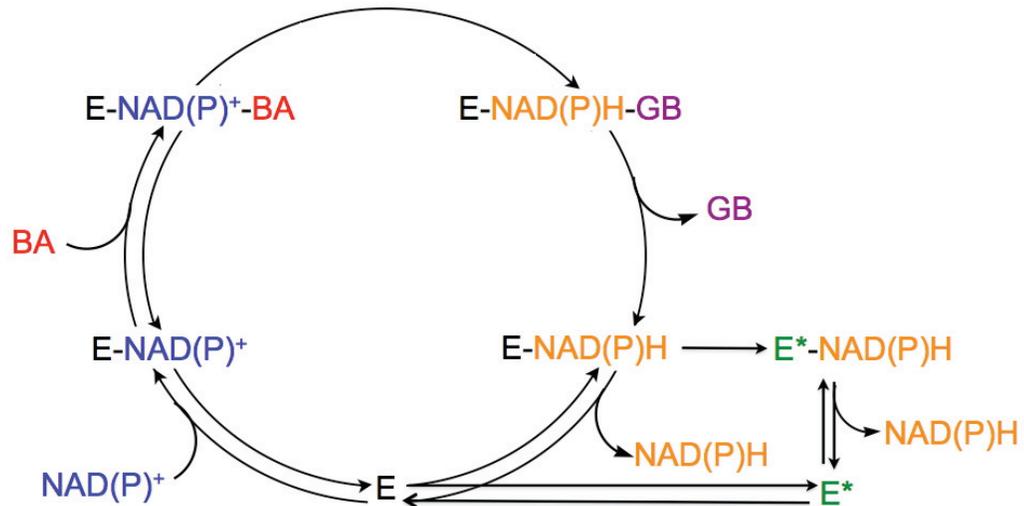


Figura 4. Inactivación de la PaBADH durante la reacción. (A) Curso temporal de la reacción obtenido usando una concentración de sustratos saturante (2 mM NAD^+ y 2 mM BA). La reacción se detiene cuando sólo se ha consumido el 10% del $NADP^+$. La flecha indica la adición de $NADP^+$ y BA a una concentración final en el medio de ensayo igual a la que había al tiempo cero de la reacción. (B) Reversibilidad de la inactivación. Cuando una enzima que se ha inactivado en la reacción se diluye 500 veces en un medio de ensayo fresco, se recupera la actividad si éste no contiene NADPH (línea 1), pero no recupera actividad si contiene NADPH a la misma concentración que se produjo cuando la reacción se detuvo (línea 2). (C) La concentración de NADPH que mantiene inactiva a la enzima después de que la reacción se ha detenido permite una actividad significativa, aunque disminuida, de la enzima si se añade desde el inicio de la reacción. (D). Dependencia del grado de avance que alcanza la reacción antes de detenerse de la concentración inicial de $NADP^+$. La línea teórica es el resultado del mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación de un hipérbola. El grado de avance mínimo estimado en este ajuste es del 10 %.



Esquema 4. Mecanismo propuesto para la formación de la especie inactiva E^* -NAD(P)H. La especie E -NAD(P)H, que es un intermediario del ciclo catalítico, puede producir la enzima libre o la especie abortiva E^* -NAD(P)H, la que se va acumulando durante el transcurso de la reacción hasta que toda la enzima queda atrapada en forma de esta especie abortiva y la reacción se detiene. Si se elimina el NAD(P)H del medio en que está la enzima, se produce la disociación del NAD(P)H y la isomerización de E^* a E , reactivándose de esta forma la enzima.

Bases estructurales de las propiedades cinéticas de las betaína aldehído deshidrogenasas

Los nicotinamín adenín dinucleótidos (o nucleótidos de piridina), tanto en su forma oxidada como reducida, se unen en un dominio de las deshidrogenasas que posee una estructura característica conocida como plegamiento Rossmann [50]. En el caso de las ALDHs este plegamiento (Fig. 5A) es ligeramente diferente al clásico descrito para las alcohol deshidrogenasas (Fig. 5B) [51]. Se ha propuesto [52] que esta estructura atípica del plegamiento Rossmann permite al nucleótido unido a las ALDHs el poseer una gran flexibilidad conformacional, necesaria para la catálisis. Efectivamente, las estructuras tridimensionales de diferentes ALDHs obtenidas sin y con el nucleótido unido han mostrado que la unión de éste no induce un cambio conformacional importante en el sitio activo, sólo el rearrreglo de algunas cadenas laterales de residuos catalíticos [44]. Es el nucleótido el que cambia de conformación durante el ciclo catalítico—al pasar de $NAD(P)^+$ a $NAD(P)H$ —para permitir que la reacción prosiga [53]. La porción de la nicotinamida del nucleótido reducido debe moverse en el sitio activo una vez que se reduce (Fig. 5C) para permitir el acceso de la molécula de agua hidrolítica al enlace tioéster que se va a romper y así liberar el producto ácido. Ello tiene como consecuencia importantes diferencias entre el $NAD(P)^+$ y el $NAD(P)H$ con respecto a la forma en que su porción nicotinamida interacciona con los residuos catalíticos de las ALDHs, así como con los intermediarios de la reacción catalizada por estas enzimas. Pero a pesar de estas diferencias, puesto que sólo existe un dominio de unión al nucleótido por sitio activo de las deshidrogenasas, el nucleótido reducido tiene que unirse al mismo sitio que el nucleótido oxidado y por tanto la unión de ambos debe ser mutuamente excluyente. De acuerdo con esto, el nucleótido reducido debe ser un inhibidor competitivo del nucleótido oxidado, el que al saturar a la enzima debe eliminar la inhibición, en el caso de deshidrogenasas que catalizan reacciones reversibles.

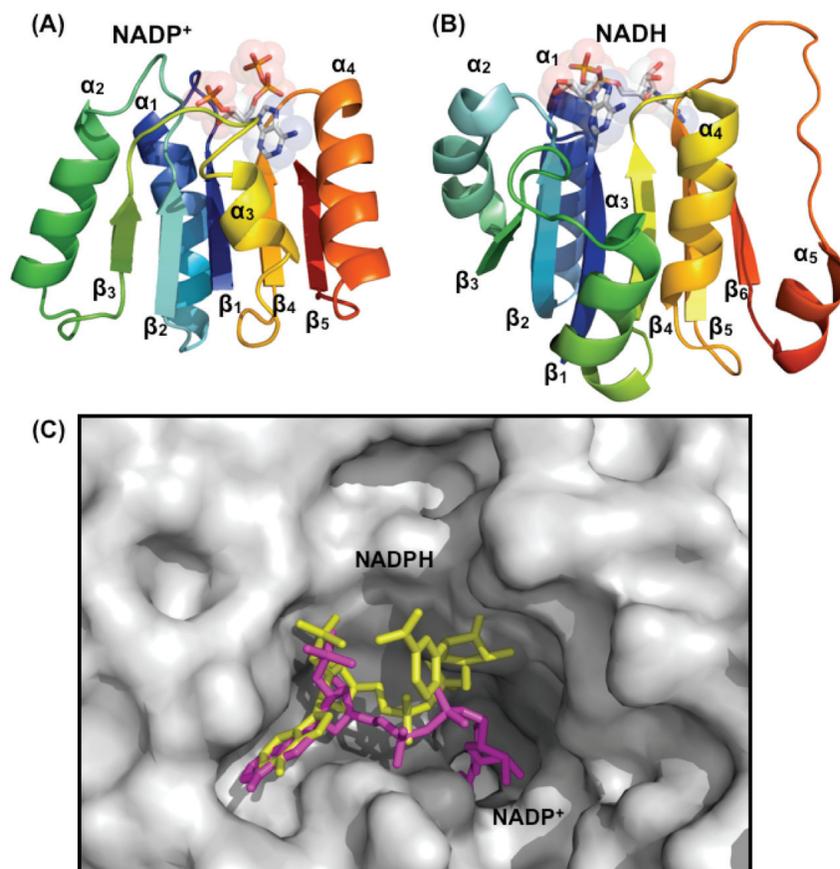


Figura 5. Sitio de unión del dinucleótido a deshidrogenasas dependientes de nicotinamín adenín dinucleótidos y conformaciones de éstos. (A) Plegamiento Rossmann modificado característico de las alcohol deshidrogenasas (ADHs) obtenido en la PaBADH [43]. (B) Plegamiento Rossmann clásico de las ADHs obtenido en la ADH de hígado de caballo [65]. (C) Sitio de unión del nucleótido mostrando la conformación adoptada por el NADP⁺ observada en la 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa de humano [54] y la conformación del NADPH observada en la lactaldehído deshidrogenasa de *E. coli* [66]. La figura se hizo con PyMOL [67] usando las coordenadas cristalográficas de 2ve5.pdb (A); de 2ohx.pdb (B); 2o2q.pdb (NADP⁺) y 2ilu.pdb (NADPH) (C).

Recientemente se determinó la estructura tridimensional de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) con NADPH unido [A.G. Díaz-Sánchez, L. González-Segura, E. Rudiño-Piñera, A. Martínez-Vázquez y R.A. Muñoz-Clares, resultados no publicados], lo que nos permitió conocer que este nucleótido forma un aducto con el grupo tiol de la cadena lateral de la cisteína catalítica (Fig. 6A), con las características que se muestran en la Fig. 6B. Este hallazgo confirmó los resultados de estudios espectroscópicos realizados en nuestro laboratorio [A.G. Díaz-Sánchez y R.A. Muñoz-Clares, resultados no publicados] que mostraban un cambio en la región UV del espectro de absorción del NAD(P)H cuando estaba en presencia de la enzima (Fig. 6C). Con anterioridad se había encontrado en otra ALDH un aducto formado entre la cisteína catalítica y el NADP⁺ [54] (Figs. 6D y E), aducto que también presenta espectros de absorción característicos que nos han permitido detectarlo en la PaBADH (Fig. 6F). De hecho, se conocía de tiempo atrás que el C4 de la nicotinamida del NAD⁺ era capaz de reaccionar con compuestos tioles de bajo peso molecular [55] y con tioles de proteínas [56], formando el tipo de aducto que

se muestra en la Fig. 6E. Pero en el caso de la nicotinamida reducida del NAD(P)H el C4 ya no es reactivo, por lo que el aducto debe formarse o en el C2 o en el C5 como se muestra en la Fig. 6A y B. La estructura cristalográfica mostró claramente que es el C2 de la nicotinamida del NADPH el que forma el aducto con el tior de la cisteína catalítica de la PaBADH (Fig. 6A).

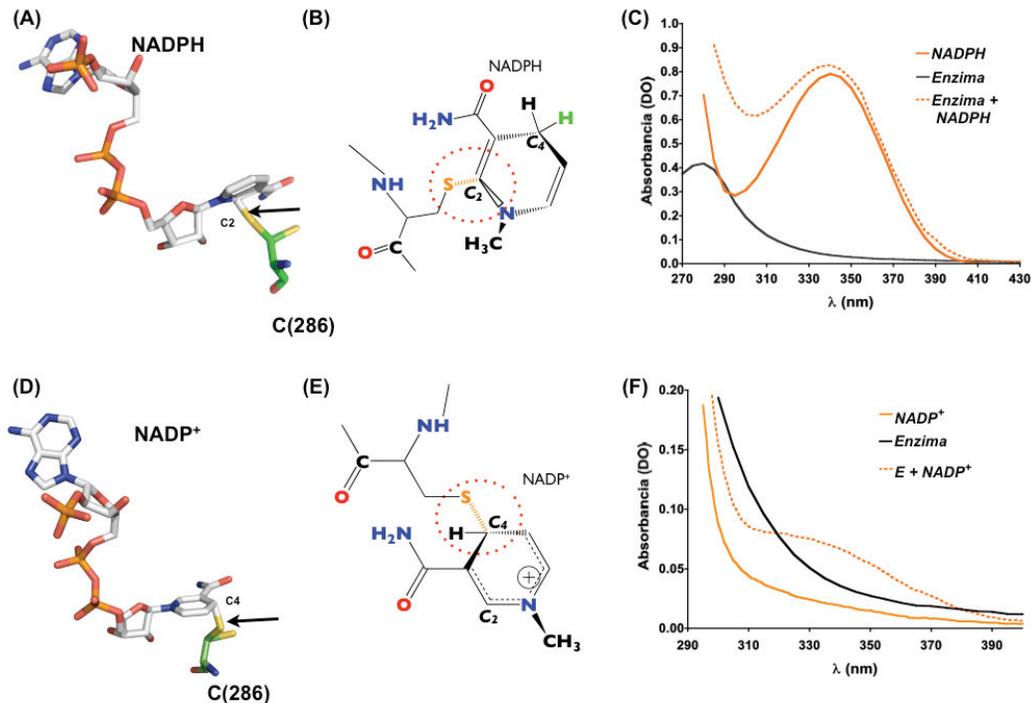


Figura 6. Aductos cisteína catalítica-NAD(P)H en las ALDHs. (A) Estructura del aducto encontrado en el cristal de la PaBADH en complejo con NADPH [A.G. Díaz-Sánchez, L. González-Segura, E. Rudiño-Piñera, A. Martínez-Vázquez y R.A. Muñoz-Clares, resultados no publicados]. El enlace covalente entre la cisteína catalítica en la conformación de descanso y el C2 del anillo reducido de la nicotinamida está indicado con una flecha. (B) Esquema de la estructura del aducto PaBADH-NADPH. (C) Cambios en los espectros de absorción UV de la PaBADH por la unión del NADPH indicativos de la formación del aducto. (D) Estructura del aducto encontrado en el cristal de la 10-formiltetrahydrofolato deshidrogenasa de humano en complejo con NADP⁺ [54] El enlace covalente entre la cisteína catalítica en la conformación de ataque y el C4 del anillo oxidado de la nicotinamida está indicado con una flecha. (E) Esquema de la estructura del aducto PaBADH-NADH. (F) Cambios en los espectros de absorción UV de la por la unión del NADP⁺ indicativos de la formación del aducto. Las figuras A y D se hicieron con PyMOL [67] usando las coordenadas cristalográficas de la PaBADH en complejo con NADPH y 2o2q.pdb, respectivamente.

Este hallazgo es de gran interés porque constituye la primera demostración de que los adenín nicotinamín dinucleótidos reducidos pueden formar aductos con el grupo tior de cisteínas de las proteínas, pero, sobre todo, porque sugiere las bases moleculares del mecanismo de la inactivación reversible por el NAD(P)H—que habíamos observado cuando incubábamos a las BADHs estudiadas en nuestro laboratorio con estos nucleótidos reducidos—y el de la inactivación durante el curso de la reacción. Esto es porque encontramos que el aducto con el NADPH se forma cuando la cisteína está en la conformación que hemos llamado de “descanso” (Fig. 6A), mientras que está en la conformación que llamamos de “ataque” en el aducto encontrado por otro grupo de investigación con NADP⁺ [54] (Fig. 6D). La BA una vez que se une

al sitio activo es capaz de romper el aducto formado por el NAD(P)^+ con la cisteína en la posición de “ataque” [54]. Probablemente éste sea un paso obligatorio de la reacción, dado que el mecanismo cinético consiste en la unión ordenada del nucleótido oxidado seguido de la unión del aldehído y el aducto se forma muy rápidamente, en un tiempo inferior a 3 ms. Pero la BA no puede romper el enlace del aducto formado por el NAD(P)H con la cisteína en la posición de “descanso”, ya que este enlace está alejado de su sitio de unión. En cuanto al NAD(P)^+ , aunque pudiera romperlo formaría otro aducto que también sería inactivo porque mantendría a la cisteína catalítica en la posición de “descanso” impidiendo así la formación del tiohemiacetal con el BA.

Por medio de la formación de este aducto el NAD(P)H disminuye la concentración de sitios activos de la enzima y produce el efecto inhibitorio sobre la V_{max} observado como el componente incompetitivo de la inhibición por estos nucleótidos. En los estudios de inhibición realizados *in vitro* esta disminución de sitios activos puede ocurrir rápidamente al inicio de la reacción en el momento en que el NAD(P)H añadido se une a la enzima. En los ensayos de actividad realizados en ausencia de NAD(P)H añadido en los que observamos inactivación durante el curso de la reacción, la disminución de sitios activos, es decir la inactivación, ocurriría a medida que la reacción transcurre y se va produciendo NAD(P)H , lo que llevaría a la progresiva acumulación del aducto—la especie que hemos nombrado como $\text{E}^*\text{NAD(P)H}$ —y a la completa inactivación de la enzima cuando toda ella se encuentre como esta especie.

De esta forma se convierte un inhibidor que debe ser competitivo por razones estructurales en uno mixto que posee un importante componente incompetitivo; es decir, en un inhibidor que no sólo disminuye la afinidad aparente de la enzima por su sustrato (aumenta la K_m) sino que también disminuye la V_{max} . Sin embargo, es importante resaltar que aunque el efecto de la formación del aducto se percibe en los estudios cinéticos de velocidad inicial como el componente incompetitivo de la inhibición mixta, no es ni mecanística ni cinéticamente equivalente. A diferencia de los inhibidores incompetitivos clásicos que son muy efectivos sólo a altas concentraciones de sustrato—lo que no permitiría disminuir significativamente la velocidad de la reacción cuando el NAD^+ se esté agotando—este mecanismo es también efectivo a bajas concentraciones de NAD^+ , puesto que se basa en la inactivación de una parte de la enzima, lo que depende solamente de la concentración del inhibidor y de la proporción de enzima libre que exista en la conformación correcta para formar el aducto con él.

Relevancia fisiológica de las propiedades cinéticas de las betaina aldehído deshidrogenasas

Las inusuales propiedades cinéticas de los dos tipos de BADHs estudiados por nosotros tienen en común dos cosas: (1) que en ambas enzimas el nucleótido reducido es más eficiente en reducir la velocidad de la reacción—ya sea por el componente incompetitivo de la inhibición mixta o por inactivación reversible de la enzima—que si se tratara de un inhibidor competitivo, y (2) que estos efectos inhibitorios o inactivantes del NAD(P)H no pueden ser revertidos por el NAD(P)^+ .

Pero ¿qué importancia fisiológica puede tener el que el NAD(P)H sea un buen inhibidor y que NAD^+ no pueda eliminar su inhibición? La respuesta está probablemente en que cualquier reacción irreversible que use un compuesto de suma importancia para el metabolismo como es el NAD^+ o el NADP^+ supone un peligro potencial para la célula y debe disponer de mecanismos para su control efectivo a corto plazo. Todas las ALDHs no fosforilantes catalizan reacciones irreversibles, pero en general están participando en la destoxicación de aldehídos que se encuentran en pequeñas cantidades, ya sean de origen endógeno, es decir producidos por el metabolismo, o exógeno, es decir contaminantes ambientales o resultado del metabolismo de fármacos. Por ello no representan un peligro real para la célula. Sin embargo, las funciones fisiológicas de las BADHs que participan en la síntesis del osmoprotector glicina betaina o en la degradación de la colina—cuando ésta es la única fuente de carbono, nitrógeno y energía para la

bacteria—implican un consumo elevado de su sustrato aldehído y con el del nucleótido oxidado. Esto puede llevar a una disminución importante de las concentraciones de NAD(P)^+ , o incluso a su agotamiento, si la reacciones que regeneran a los nucleótidos oxidados a partir de sus formas reducidas poseen, en conjunto, una velocidad inferior a la de la BADH. Particularmente en el caso del NAD^+ esta situación sería extremadamente peligrosa. Es por ello de suma importancia que las BADHs tengan mecanismos que frenen su actividad en condiciones en las que exista el riesgo de llegar a una concentración de NAD^+ tan baja que pueda comprometer la viabilidad de la célula. La inhibición o inactivación por NADH es el freno más importante que se le puede poner a esta reacción irreversible para evitar el agotamiento del NAD^+ , ya que el otro producto de la reacción, la GB, no inhibe aun a concentraciones muy elevadas [19,27,33]. La incapacidad del producto ácido de inhibir la reacción catalizada por las BADHs es una característica común de las ALDHs [57-59], cuyas bases estructurales aún no están claras.

Las concentraciones de NADH reducido en la mayoría de las células son sólo un porcentaje pequeño de las de NAD^+ [60,61], por lo que a no ser que la afinidad de la enzima por el NADH sea mucho mayor que por el NAD^+ —lo que no ocurre en las BADHs [62]—no podría funcionar como un inhibidor muy efectivo hasta que la concentración de NAD^+ disminuyera hasta niveles que serían peligrosos. Es necesario evitar esta posibilidad, por lo que se requiere que el NADH sea capaz de inhibir en forma efectiva si su concentración aumenta aun cuando la del NAD^+ siga siendo alta y, sobre todo, es necesario que el NADH sea capaz de detener la reacción si ésta está ocurriendo a una velocidad muy alta. Esto es especialmente importante para el caso de la PaBADH cuya k_{cat} es de las más altas de las ALDHs estudiadas hasta la fecha [33]. Este objetivo se logra por medio de los dos mecanismos descritos, la inhibición incompetitiva y la inactivación de la enzima durante la reacción cuando los sustratos están cercanos a la saturación.

Las condiciones fisiológicas en las que la actividad de las BADHs de *P. aeruginosa* y del cloroplasto se desarrolla son bastante diferentes y ello exige diferencias en la regulación de su actividad. Como discutiremos a continuación, nuestros estudios hasta el momento nos han permitido conocer y entender en parte cómo las propiedades funcionales y estructurales de estas enzimas se modifican y adaptan para que aun catalizando la misma reacción se integren a diferentes contextos metabólicos.

En el caso de la reacción NAD^+ -dependiente de la PaBADH, el componente incompetitivo de la inhibición del NADH frente al NAD^+ así como inactivación producida por NADH probablemente no tengan lugar bajo condiciones aeróbicas normales en las que haya un aporte suficiente de oxígeno, dado que la bacteria puede regenerar el NAD^+ vía cadena respiratoria. Pero pueden constituir una importante válvula de seguridad cuando la regeneración del NAD^+ esté comprometida por escasez de oxígeno —que obliga a la bacteria a usar una cadena de transporte de electrones más lenta— o por una velocidad muy alta de la reacción. En cuanto a la reacción NADP^+ -dependiente no existe tal riesgo y como además los niveles de NADP^+ y NADPH son muy similares en células procarióticas [63], el NADPH puede ser un inhibidor efectivo de la reacción. Es quizás por estas razones el que en la PaBADH la inhibición del NADPH es competitiva con respecto al NADP^+ [33]. Es interesante que esta enzima tiene una afinidad por el NADP^+ , medida por la K_d , dos veces superior a la que tiene por el NAD^+ , por lo que aun cuando la concentración del NADP^+ sea menor que la del NAD^+ , la reacción NADP^+ -dependiente puede llegar a constituir una proporción significativa de la NAD^+ -dependiente.

En el cloroplasto la poza del par NAD^+/NADH no está en equilibrio con la del par $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, por lo que los niveles de NAD^+ no se pueden regular mediante las reacciones fotosintéticas de asimilación del carbono. Por ello, en las BADHs de cloroplasto sí tiene una gran importancia la regulación a corto plazo por el NADH para evitar el agotamiento del NAD^+ intracloroplástico. Pero el riesgo de inhibir a la chBADH es que se acumule BA—que está siendo producido activamente bajo condiciones de estrés osmótico por la colina monooxigenasa [64]—ya que este aldehído es altamente tóxico para la planta [36]. La regulación a corto plazo de la

actividad de las chBADHs debe ser tal que evite el agotamiento del NAD⁺ y al mismo tiempo evite la acumulación de BA. Probablemente ésta es la razón por la que—además de las peculiares propiedades cinéticas de la BADH bacteriana ya mencionadas—la enzima de cloroplasto presenta una inhibición parcial por su sustrato BA [25] que conlleva una inhibición parcial por el NADH. La inhibición por BA se demostró que se debe al establecimiento de una ruta alterna de liberación del NADH más lenta que la ruta que opera a bajas concentraciones del aldehído [25]. A concentraciones altas, la BA puede unirse al complejo Enzima-NADH formando un complejo ternario no productivo Enzima-NADH-BA del cual puede liberarse el NADH, lo que causa que tanto la inhibición por sustrato como por NADH sea parcial. Creemos que tanto la inhibición parcial por altas concentraciones de BA como la inhibición parcial por NADH son de gran importancia para la enzima de cloroplasto, ya que probablemente en este organelo las reacciones de regeneración del NAD⁺ son más lentas que las que existen en *P. aeruginosa* y se puede por tanto alcanzar concentraciones tan altas de NADH que de no existir la ruta alterna de la reacción producirían una inhibición total y la acumulación de BA, con los efectos tóxicos que esto conllevaría.

Comentarios finales

Los mecanismos de regulación a corto plazo aquí descritos de la actividad de las BADHs por el nucleótido reducido—en conjunción con la regulación por la BA en el caso de la enzima de cloroplasto—no han sido descritos hasta la fecha para otras enzimas. Estos mecanismos se basan en propiedades estructurales que probablemente comparten muchas otras ALDHs. En el caso de las BADHs la regulación a corto plazo responde a claras necesidades metabólicas.

Agradecimientos

Los trabajos de investigación mencionados del grupo al que pertenecen los autores fueron realizados con el apoyo financiero de CONACYT y DGAPA-UNAM a proyectos de RAMC. Los autores agradecen el valioso apoyo técnico de Carlos Mújica-Jiménez en los trabajos de investigación de nuestro grupo aquí descritos.

Referencias

1. Segel, H. I. (1993) *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Wiley Classics Library Edition, Wiley-Interscience Publication, USA
2. Cornish-Bowden, A. (1999) *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. 1st Ed., Portland Press LTD. UK
3. Rothschild, H. A., Guzman-Barron, E. S. (1954) *J. Biol. Chem.* **209**, 511-523
4. Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y., Ogata, K. (1976) *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1743-1749
5. Weretilnyk, E. A., Hanson, A. D. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 56-63
6. Falkenberg, P., Strøm, A. R. (1990) *Biochem. Biophys. Acta*, **1034**, 253- 259
7. Valenzuela-Soto, E. M., Muñoz-Clares, R. A. (1994) *J. Plant Physiol.* **143**, 145-152
8. Guzmán-Partida, A. M., Valenzuela-Soto, E. M. (1998) *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* **119**, 485-491
9. Klein, J. R., Handler, P. (1942) *J. Biol. Chem.* **144**, 537-539
10. Julián-Sánchez, A., Viveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L. P., Velasco-García, R., Muñoz-Clares, R. A. (2007) *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. Weiner, H. (ed). Indianapolis, USA
11. Petronini, P. G., De Angelis, E. M., Borghetti, P., Borghetti, A. F., Wheeler, K. (1992) *Biochem. J.*, **282**, 69-73
12. Vojtěchová, M., Hanson, A. D., Muñoz-Clares, R. A., (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 81-88
13. Boch, J., Kempf, B., Schmid, R., Bremer, E. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 5121-5129
14. Smith, L. T., Smith, G. M. (1988) *J. Bacteriol.*, **171**, 4714-4717
15. Velasco-García, R., Villalobos, M. A., Ramírez-Romero M. A., Mújica-Jiménez, C., Iturriaga, G., Muñoz-Clares, R. A. (2006), *Arch. Microbiol.* **185**, 14-22
16. Ambroziak, W., Pietruszko, R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13011-13018

17. Lin, S. W., Chen, J. C., Hsu, L. C., Hsieh, C. L., Yoshida, A. (1993) *Genomics*, **34**, 376-380
18. Vaz, F. M., Fouchier, S. W., Ofman, R., Sommer, M., Wanders, R. J. A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 7390-7394
19. Figueroa-Soto, C. G., Valenzuela-Soto, E. M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 596-603
20. Velasco-García, R., Chacón-Aguilar, V. M., Hervert-Hernández, D., Muñoz-Clares, R. A. (2003) *Chem. Biol. Interact.* **143-144**, 149-158
21. Valenzuela-Soto, E. M., Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Gaviria-González, L. L., Muñoz-Clares, R. A. (2003) *Chem. Biol. Interact.* **143-144**, 139-148
22. Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Contreras-Díaz, L. (2003) *Chem. Biol. Interact.* **143-144**, 129-137
23. Muñoz-Clares, R. A., Mújica-Jiménez, C. (2001) *Chem. Biol. Interact.* **130-132**, 71-80
24. Legaria, J., Rajsbaum, R., Muñoz-Clares, R. A., Villegas-Sepúlveda, N., Simpson, J., Iturriaga, G. (1998) *Gene* **218**, 69-76
25. Vojtechová, M., Rodríguez-Sotres, R., Valenzuela-Soto, E. M., Muñoz-Clares, R. A. (1997) *Biochim. Biophys. Acta.* **1341**, 49-57
26. Muñoz-Clares, R. A., Vojtechová, M., Mújica-Jiménez, C., Rodríguez-Sotres, R. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* **414**, 261-268
27. Valenzuela-Soto, E. M., Muñoz-Clares, R. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23818-23823. Erratum in: *J. Biol. Chem.* (1994) **269**, 4692
28. Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G., Muñoz-Clares R. A. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 1292-1300
29. González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Muñoz-Clares, R. A. (2009) *Chem. Biol. Interact.* **178**, 64-69
30. Velasco-García, R., Zaldívar-Machorro, V. J., Mújica-Jiménez, C., González-Segura, L., Muñoz-Clares, R. A. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 408-415
31. González-Segura, L., Velasco-García, R., Rudiño-Piñera, E., Mújica-Jiménez, C., Muñoz-Clares, R. A. (2005) *Biochimie.* **87**, 1056-1064
32. González-Segura, L., Velasco-García, R., Muñoz-Clares, R. A. (2002) *Biochem. J.* **361**, 577-585
33. Velasco-García, R., González-Segura, L., Muñoz-Clares, R. A. (2000) *Biochem. J.* **352**, 675-683
34. Hölstrom, K. O., Somersalo, S. A., Mandal, A., Palva, T. E., Welin, B. (2000) *J. Exp. Bot.* **51**, 177-185
35. Yilmaz, J. L., Bulow, L. (2002) *Biotechnol. Prog.* **18**, 1176-1182
36. Rathinasabapathi, B., McCue, K. F., Gage, D. A., Hanson, A. D. (1994) *Planta* **193**, 155-162
37. Jia, G. X., Zhu, Z. Q., Chang, F. Q., Li, Y. X. (2002) *Plant. Cell. Reports* **21**, 141-146
38. Rontein, D., Basset, G., Hanson, A. D. (2002) *Metabolic. Eng.* **4**, 49-56
39. Li, Q. L., Gao, X. R., Yu, X. H., Wang, X. Z., An, L. J. (2003) *Biotech. Letters* **25**, 1431-1436
40. Mori, N., Yoshida, N., Kitamoto, Y. (1992) *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 352-356
41. Sage, A. E., Vasil, A. I., Vasil, M.L. (1997) *Mol. Microbiol.* **23**, 43-56.
42. Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H., Eklund, H. (1998) *Protein Sci.* **7**, 2106-2117
43. González-Segura, L., Rudiño-Piñera, E., Muñoz-Clares, R. A., Horjales, E. (2009) *J. Mol. Biol.* **385**, 542-557
44. Steinmetz, C.G., Xie, P., Weiner, H., and Hurley, T.D. (1997) *Structure* **5**, 701-711
45. Vallari, R. C., Pietruszco, R. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 9-19
46. Plapp, B.V. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 1727-1735
47. Plapp, B. V., Mitchell, J. L., Berst, K.B. *Chem. Biol. Interact.* **130**, 445-456
48. Ohshima, T., Misono, H., Soda, K. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 5719-5725.
49. Cleland, W. W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 104-137
50. Rossmann, M. G., Moras, D., Olsen, K. W. (1974) *Nature* **250**: 194-199
51. Liu, Z.J., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, C.D., Chang, W.R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J., Wang, B. C. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 317-326
52. Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant G., Aubry, A. (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 161-173
53. Pérez-Miller, S. J., Hurley, T. D. (2003) *Biochemistry* **42**, 7100-7109
54. Tsybovski, Y., Donato, H., Krupenko, N.I., Davies, C., Krupenko, S.A. (2007) *Biochemistry* **46**, 2917-2929
55. Van Eys, J., Kaplan, N.O. (1957) *J. Biol. Chem.* **228**, 305-314
56. Segal, H., Boyer, P.D. (1953) *J. Biol. Chem.* **204**, 265-281
57. Bradbury, S. L., Jakoby, W. B. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1834-1840
58. Satya-Narayan, V., Nair, P.M. (1990) *Plant Sci.* **71**, 159-166
59. Feldman, R.I., Weiner, H. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 267-272
60. Igamberdiev, A. U., Bykova, V., Lea, P. J., Gardeström, P. (2001) *Physiol. Plant.* **111**, 427-438
61. Hampp, R., Goller, M., Füllgraf, H. (1984) *Plant Physiol.* **75**, 1017-1021

62. Schafer, F., Buettner, G. (2001). *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1191–212
63. Appleman, J.R., Beard, W.A., Delcamp, T.J., Prendergast, N.J., Freisheim, J.H., Blakey, R.L. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 2740-2748.
64. Burnet, M., Lafontaine, P. J., Hanson, A. D. (1995), *Plant Physiol.* **108**, 581-588
65. Al-Karadaghi, S., Cedergren-Zeppezauer, E.S. (1994) *Acta Crystallogr.* **50**, 793-807
66. Di-Costanzo, L., Gomez, G.A., Christanson, D.W. (2007) *J. Mol. Biol.* **366**, 481-493
67. DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System on the World Wide Web. <http://www.pymol.org/>

Semblanza de la Dra. Rosario A. Muñoz Clares



Nació en Granada, España, en cuya Universidad realizó sus estudios de licenciatura y doctorado obteniendo las máximas calificaciones. Después de estancias postdoctorales en las universidades de Kent y Manchester, Inglaterra, se incorporó en 1981 al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, en el que actualmente es Profesora Titular C definitiva de tiempo completo. Es nivel “D” del PRIDE, investigadora Nivel III del Sistema Nacional de Investigadores y tuvo el nombramiento de Catedrático UNAM, Nivel II. Ha realizado estancias de investigación en la Universidad Autónoma de Madrid y en la Universidad de Vanderbilt, en Nashville, EUA. Su quehacer científico, que versa sobre la caracterización cinética y molecular de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas, así como

el estudio de la relación estructura-función de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de plantas y bacterias, se ha publicado en 54 artículos científicos internacionales y 9 nacionales. Cuenta con 400 citas a sus publicaciones. Ha presentado 43 trabajos en congresos internacionales y 67 en congresos nacionales. En la Universidad Nacional Autónoma de México ha impartido 79 cursos curriculares de licenciatura y posgrado; además, ha asesorado o está asesorando a 15 alumnos de licenciatura y 23 de posgrado y ha formado parte del Comité Tutoral de 67 alumnos de diferentes posgrados nacionales. La comunidad científica la ha invitado a impartir 19 conferencias en diferentes congresos nacionales e internacionales. Dentro de la UNAM se ha desempeñado o desempeña como Coordinadora de la Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas en la Facultad de Química; Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química; miembro de la Comisión Dictaminadora y del PRIDE de los Institutos de Ecología, Fisiología Celular, Biotecnología, e Investigaciones Biomédicas y como consejera propietaria del CAABYs por la Facultad de Química. Fuera de la UNAM, ha pertenecido o pertenece a diferentes Comités de Evaluación como la Comisión de Premios de la Academia Mexicana de Ciencias, la Comisión Evaluadora Externa del Centro de Investigación Científica de Yucatán y la Comisión Dictaminadora del Centro de Investigación Científica de Yucatán y del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, y al Comité de Acreditación de Evaluadores del Área VI del CONACYT, entre otros.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

MECANISMOS MOLECULARES DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DEL ARSÉNICO

Libia Vega Loyo

Sección Externa de Toxicología, CINVESTAV-IPN

Av. IPN 2508, San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, 07360, México D. F.

lvega@cinvestav.mx

Resumen

La exposición a arsénico (As) en el agua de beber se relaciona con enfermedades que presentan diferente incidencia dependiendo del área geográfica. Los efectos más evidentes están relacionados con el desarrollo de cáncer de piel y con alteraciones en otros órganos, como el hígado, el riñón, la vejiga o los pulmones que también pueden conducir a cáncer. Probablemente la carcinogenicidad del As esté asociada con los efectos genotóxicos que presenta ya que se ha demostrado que el As produce mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas, aneuploidías y la inhibición de enzimas de reparación del DNA. Otro factor importante en el desarrollo del cáncer es la inmunosupresión de los individuos. Se han realizado pocos estudios epidemiológicos en poblaciones expuestas a As que investiguen el estado del sistema inmune. Algunos de ellos indican que la exposición a niveles bajos de As induce, en ciertos individuos, una mejor respuesta inmunológica. Cuando los humanos se exponen a concentraciones altas de As en el agua de bebida presentan un riesgo mayor de desarrollar cáncer y también una incidencia mayor de infecciones oportunistas, parasitosis, desarrollo de alergias y asma. Estas alteraciones se relacionan con la incapacidad de mantener una intercomunicación adecuada entre los diferentes elementos que conforman el sistema inmune. En nuestro grupo, hemos estudiado algunos de los mecanismos por los que el As puede alterar el delicado balance y la regulación de las células inmunes. La exposición a As a través de agua de bebida en poblaciones humanas inhibe la respuesta proliferativa de las células mononucleadas de sangre periférica y altera la secreción de citocinas de las células activadas dependiendo del tipo de estímulo con que se encuentren (mitogénico inespecífico o antigénico específico). El As también reduce la proporción de células T ayudadoras (CD4) en relación con la cantidad de células T citotóxicas (CD8) [CD4/CD8] en niños expuestos. Este parámetro de inmunosupresión general se asocia con un riesgo elevado de desarrollar cáncer de piel. Adicionalmente, la exposición a As aumenta la secreción de moléculas proinflamatorias como el factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) en células

mononucleadas, causando un estado de inflamación crónica que también se asocia con el desarrollo de cáncer. Los datos obtenidos a partir de estudios en humanos indican que la exposición a As altera diferentes tipos celulares dentro del organismo y tiene diferentes efectos entre los individuos dependiendo del género y del estado de nutrición. La exposición a As es capaz de modificar vías de activación específicas en los linfocitos, particularmente en las células T ayudadoras (Th). Estudios subsecuentes sobre los mecanismos moleculares de estas alteraciones han indicado que el As modifica la vía de diferenciación de las células Th hacia el tipo Th1 variando el estado de fosforilación de algunas proteínas directamente unidas al receptor de célula T (TCR) lo que conduce a alterar la cascada de transducción de señal dependiente del TCR e interferir con las señales de activación de los linfocitos T, llevándolos hacia la apoptosis y, en última instancia, hacia la falta de una respuesta inmune adecuada.

Palabras clave: Carcinogenicidad, inmunotoxicología, arsénico, transducción de señales, células T.

Abstract

Exposure to arsenic in drinking water is related with many health effects that have different incidences depending on the geographical area. The most evident effects are often related with skin cancer development and with alterations on other organs as liver, kidney, bladder, or lung that could also be related with cancer development on these organs. The most studied effects of arsenic are associated with its carcinogenic and/or genotoxic activity. It has been demonstrated that arsenic is able to induce point mutations, chromosomal aberrations, aneuploidy, and inhibition of DNA repair enzymes. Immunosuppression of the individuals is another factor that strongly enhances cancer development. Not many epidemiological studies have been conducted in arsenic exposed populations with the aim to investigate the immunological status of the individuals. Some experimental studies indicate that exposure to low levels of arsenic induces a better immune response in certain individuals. When human populations are exposed to high levels of arsenic in their drinking water, besides the risk to develop certain types of cancer, they could also present opportunistic infections, parasitosis, allergies development, and asthma. These alterations are related with the failure to maintain an equilibrated response among all the elements in the immune system. Our group has studied some of the mechanisms by which arsenic can alter the delicate balance and regulation of the immune cells and increase the incidence of certain diseases. Arsenic exposure on human populations inhibits the proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and alters the cytokines secretion profile of the activated cells depending on the type of stimuli. In children exposed to arsenic the proportion of T helper cells (CD4) relative to T cytotoxic cells (CD8) [CD4/CD8] is reduced; this parameter indicates general immunosuppression. Additionally, arsenic exposure increases the secretion of certain inflammatory molecules, such as the granulocytes/monocytes-colony stimulation factor (GM-CSF) secreted by macrophages, causing an inflammatory chronic state that is also related with cancer development. Other studies indicate that arsenic exposure can alter different human cell types and the effects depend on gender, and on the nutritional status. Arsenic exposure is able to modify a specific activation pathway on lymphocytes, particularly on T helper cells (Th). Further studies on the molecular mechanisms of these alterations have indicated that arsenic is able to modify the differentiation pathway of Th cells to the Th1 type by modifying the phosphorylation status of some proteins directly bound to the T cell receptor (TCR) and the transduction signal cascade depending on the TCR, thus

interfering with the activation signals of T lymphocytes and driving them to apoptosis and ultimately, a lack of an adequate immune response.

Keywords: Carcinogenicity, immunotoxicology, arsenic, signal transduction, T cells.

El arsénico

El arsénico inorgánico (iAs) es un carcinógeno humano potente y un tóxico generalizado con diversos mecanismos de acción. Más de un millón de personas están expuestas a concentraciones elevadas de iAs, principalmente a través del agua de bebida (más de 50 mg/l), pero también por emisiones industriales. La exposición a iAs en el agua de bebida se asocia con efectos en la salud que tienen diferente incidencia dependiendo del área geográfica, el grupo étnico, la edad, el género, así como del estado nutricional [1-6]. Aunque los efectos más evidentes de la exposición a iAs están relacionados con afecciones de la piel (como hiperqueratosis, hipopigmentación y cáncer de piel), también produce alteraciones en otros órganos como el hígado, el riñón, la vejiga o el pulmón, las cuales pueden conducir también al desarrollo de cáncer en estos órganos [7,8].

En México, los niveles de iAs en el agua de bebida son muy variados (Tabla I). La mayor parte del iAs proviene de fuentes naturales, siendo los pozos profundos los más contaminados por estar en contacto directo con un suelo de origen volcánico. La exposición a iAs en el agua de bebida es un problema de salud pública importante en los Estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo y San Luis Potosí, donde varias regiones presentan una incidencia elevada de enfermedades relacionadas con la exposición a iAs. En estas áreas la exposición a iAs también se asocia con la incidencia de diabetes [14], un coeficiente intelectual reducido [15] e infertilidad [16].

Tabla I. Concentraciones reportadas de iAs en el agua de bebida en algunos estados de México

iAs (mg/l)	Estado	Referencia
390	Coahuila	[9]
263	Jalisco	[10]
66	Sonora	[11]
378	Hidalgo	[12]
725	Durango	[13]
65	Chihuahua	[14]
194	San Luis Potosí	[15]

Efectos genotóxicos de la exposición a iAs

Se ha demostrado que el iAs posee actividad genotóxica ya que induce mutaciones puntuales en el locus del gen de la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), aberraciones cromosómicas [9] y células micronucleadas [13], presentando diferencias en la susceptibilidad de los individuos [6,17]. El iAs reduce la proliferación de células mononucleadas de sangre periférica (Fig. 1) [18,19], induce arresto mitótico [17] e inhibe enzimas de reparación del DNA en humanos, como ERCC-1 y PARP-1 [20,21]. También induce la expresión de varios

genes relacionados con el desarrollo de cáncer como p53 y p21, lo que conlleva a que las células muestren alteraciones en su ciclo celular y puedan transformarse [22,23].

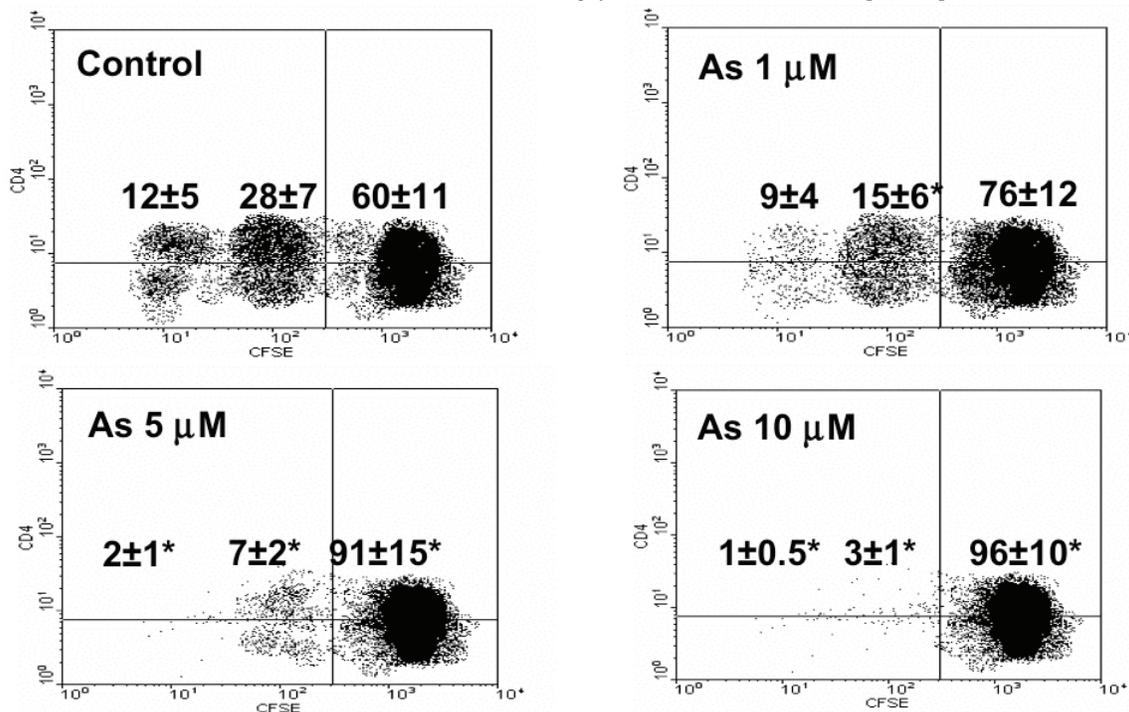


Figura 1. Porcentaje de proliferación en células de bazo de ratones tratados *in vitro* con arsenito de sodio (As). Evaluación por dilución del colorante CFSE. Las células se incuban con CFSE por 30 min, se exponen a arsenito de sodio por 72 h y se agregan anticuerpos anti-CD3/CD28 para estimular la proliferación celular. Posteriormente se lavan y se fijan las células y se analizan en un citómetro de flujo (10,000 eventos por muestra). Las células que no se han dividido se observan como una nube compacta en 10^3 unidades de fluorescencia, las células que se han dividido dos o tres veces se muestran como nubes menos compactas en 10^2 y 10^1 unidades de fluorescencia, respectivamente. * $p > 0.05$, t de Student.

Inmunotoxicidad del iAs

Además de la genotoxicidad directa, la inmunosupresión de los individuos es un factor que contribuye de manera muy importante en los procesos de carcinogénesis [24]. Se ha demostrado en animales y en modelos *in vitro* que la exposición a iAs reduce la respuesta de hipersensibilidad por contacto [25] y modifica el perfil de secreción de citocinas en diferentes tipos celulares [26-29]. No se han realizado muchos estudios enfocados a determinar el estado inmunológico de los individuos expuestos a iAs debido a la compleja red de células y mediadores solubles (citocinas) que participan en la respuesta inmune (Fig. 2). De una manera general, la respuesta inmune específica comienza cuando una célula presentadora de antígeno profesional (APC) se encuentra con un antígeno (Ag), lo fagocita, lo procesa (mediante procesos específicos de degradación de proteínas) y lo presenta en la membrana unido a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Después los linfocitos T reconocen dicho Ag y se activan. Esta activación genera la diferenciación de las células T y éstas a su vez inician cascadas de respuestas celulares que culminan con la eliminación del Ag.

En la Tabla II se muestran algunos de los efectos inmunotóxicos reportados del iAs. En particular, sólo dos estudios han establecido una relación directa entre la exposición a iAs en el

agua de bebida y un aumento en la incidencia de infecciones oportunistas y enfermedades relacionadas con la capacidad de respuesta del sistema inmune como alergias y asma en poblaciones humanas expuestas [29,30]. La mayoría de las evidencias de la inmunosupresión ocasionada por la exposición a iAs provienen de modelos animales o de estudios *in vitro* con células humanas. Algunos estudios experimentales indican que la exposición a niveles extremadamente bajos de iAs (rango pico molar) inducen una respuesta inmune más eficiente en algunos individuos mientras que no se observan efectos en otros.

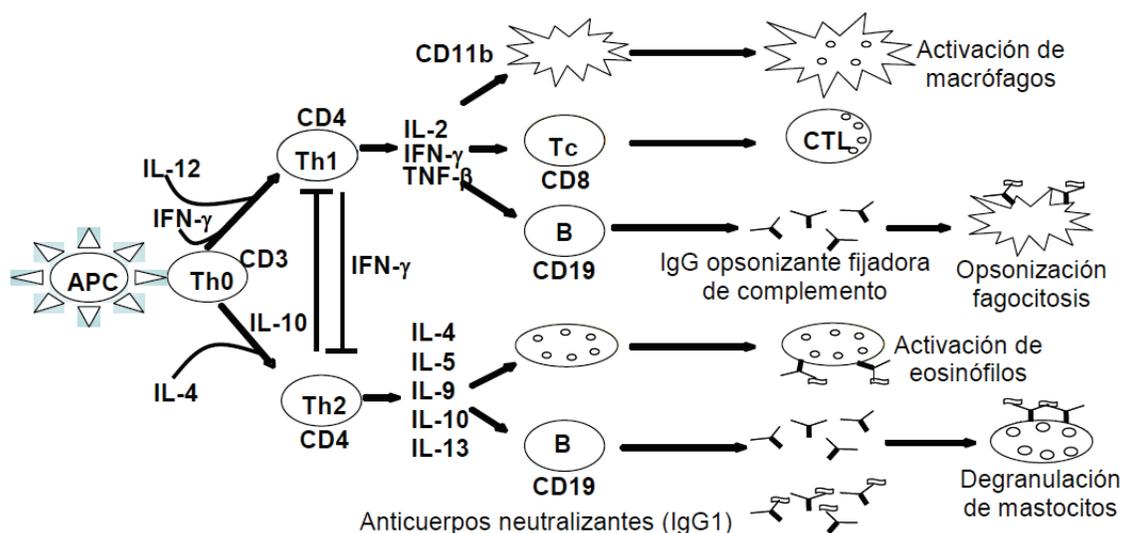


Figura 2. Funciones efectoras de la inmunidad adquirida (Th1/Th2) del sistema inmune. APC; Célula presentadora de antígeno, IL; Interleucina, IFN; Interferón, TNF; Factor de necrosis tumoral, Th; Célula T ayudadora, Tc; Célula T citotóxica, B; Célula B, CTL; Célula T citotóxica activada.

Tabla II. Efectos inmunotóxicos de la exposición a iAs en poblaciones humanas

Efecto	Referencia
Reduce secreción de TNF- α IL-4, IL-5 e IL-10 en células T aumenta las infecciones oportunistas	[29]
Incrementa la expresión de Bcl-2 reduce la de Jak2 y la fosforilación de STAT3 en células uroteliales	[31]
Aumenta la expresión de COX-2 en linfocitos	[22]
Disminuye la maduración de monocitos	[32]
Incrementa expresión de TGF- α en células uroteliales	[12]
Aumenta la incidencia de asma y niveles séricos de IgG, IgE e IgA	[33]
Incrementa incidencia de asma y alergias y la secreción de GM-CSF en monocitos, inhibe proliferación y secreción de IL-2 e IFN- γ	[30]

Cuando una población humana está expuesta a niveles elevados de iAs se presenta un riesgo elevado de desarrollar ciertos tipos de cáncer, infecciones oportunistas, parasitosis, asma y alergias [30]. La exposición humana a iAs inhibe la respuesta proliferativa de los linfocitos [19] y modifica el perfil de citocinas que secretan dependiendo del tipo de estímulo que se aplique a las células [34]. El iAs también reduce la proporción de células T ayudadoras (CD4) en relación con las células T citotóxicas (CD8) en niños expuestos, generalmente la reducción en este parámetro indica un estado de inmunosupresión general. Por otro lado, la exposición a iAs induce la secreción de algunos factores inflamatorios como el factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) producido por macrófagos, causando un estado crónico de inflamación que también se asocia con el desarrollo de cáncer [30].

En el organismo, el iAs con valencia 5+ es reducido a 3+ para ser metilado una vez y producir ácido monometilarsénico (MMA) con valencia 5+, este compuesto se reduce de nuevo a 3+ para ser metilado nuevamente y producir ácido dimetilarsénico (DMA). Se propone que existe una tercera serie de reducciones y metilaciones que daría como resultado arsénico trimetilado. Todos estos compuestos se pueden excretar fácilmente en la orina de los individuos expuestos y sirven como marcadores de exposición en poblaciones humanas [12]. Se sabe que la toxicidad de los compuestos arsenicales puede aumentar con estas biotransformaciones, siendo los compuestos orgánicos de arsénico con valencia 3+ los que presentan una toxicidad mayor incluso que el mismo iAs mientras que los compuestos arsenicales con valencia 5+ no presentan toxicidad [28].

El metabolismo del iAs puede modificarse por la misma concentración ingerida y por el género aún en niños pequeños como se muestra en la figura 3 [35]. La tasa metabólica, es decir, la proporción del iAs que es metilado una vez (MMA), y la proporción de este MMA que es metilado por segunda ocasión (DMA), cambia cuando la concentración de iAs aumenta; a concentraciones bajas ($< 50 \mu\text{g/l}$) la primera metilación se produce más eficientemente que la segunda y cuando la concentración de iAs a la que se encuentran expuestos los individuos aumenta ($> 50 \mu\text{g/l}$), entonces la segunda metilación se produce de manera más eficiente (Fig. 3B). Adicionalmente al efecto de la concentración de iAs, podemos observar que el patrón de metilación del arsénico se modifica dependiendo del género del individuo expuesto, de tal modo que los niños presentan una primera metilación muy eficiente y una menor eficiencia en la segunda metilación, al contrario que las niñas, en las que se observa una mayor eficiencia en la segunda metilación para producir DMA en mayor cantidad que los niños expuestos a las mismas concentraciones de iAs (Fig. 3C).

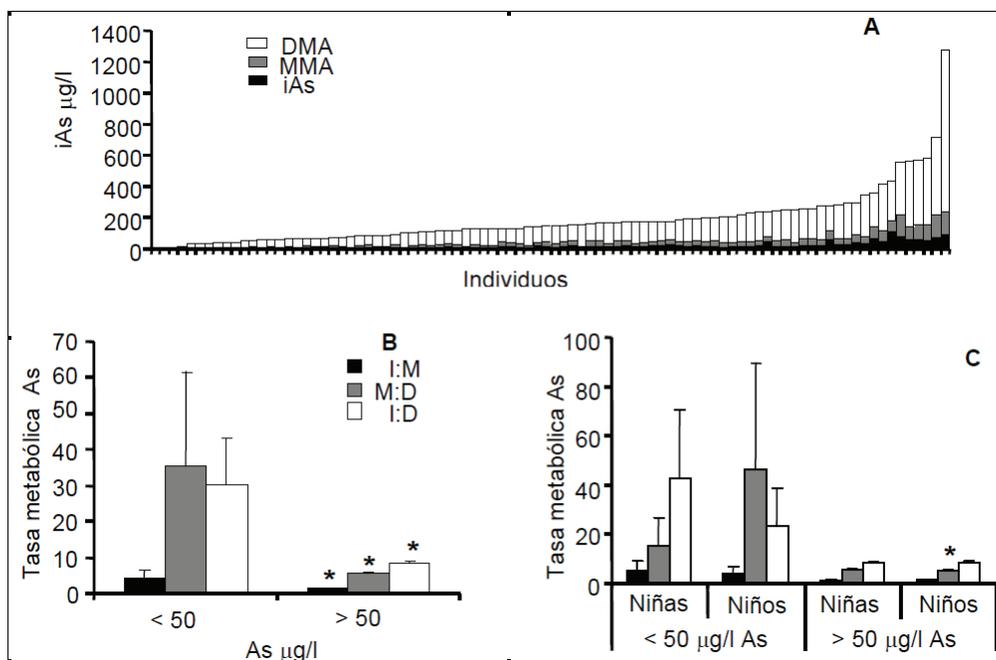


Figura 3. Distribución de metabolitos de As en la orina de niños (6-10 años) expuestos a iAs en agua de bebida (A), tasa metabólica en los grupos de alta y baja exposición (B), y entre niñas y niños (C). La tasa metabólica se define como la proporción del iAs que es metilado una vez para formar MMA (I:M), la proporción del MMA que es metilado por segunda vez para formar DMA (M:D) y la proporción de iAs que es metilado dos veces (I:D). * $p < 0.05$, t de Student [35].

Estudios a nivel molecular

Se ha descrito que la exposición a iAs modifica vías de activación específicas en los linfocitos, particularmente la vía de activación de la interleucina 2 (IL-2) en células Th1 [36]. Como se muestra en la figura 4, el proceso de activación de una célula T es muy complejo y puede tener como resultado diferentes eventos celulares dependiendo del conjunto de señales que se presenten simultáneamente y del orden en que se presenten estas. De tal modo, una célula T puede proliferar, producir una de diferentes series de citocinas, volverse una célula no responsiva (anergia o tolerancia) o iniciar el proceso de muerte celular por apoptosis. Estudios posteriores sobre los mecanismos moleculares del iAs sobre las vías de activación de los linfocitos han indicado que el iAs puede modificar el proceso de diferenciación de las células Th hacia Th1 al alterar el estado basal de fosforilación de algunas proteínas (como lck y fyn) directamente unidas al receptor de células T (TCR) y por lo tanto, modificar la cascada de transducción de la señal que depende tanto del TCR como de otras moléculas co-estimuladoras [34]. En la mayoría de los casos se han estudiado moléculas implicadas en la transducción de señales que son comunes a diferentes vías y que se encuentran asociadas a varios receptores (Tabla III). Una molécula más específica en la cascada de transducción de señales de los linfocitos T es la cinasa lck (asociada al complejo TCR de activación) y que se encuentra río arriba en la cascada de señalización de las cinasas anteriormente estudiadas.

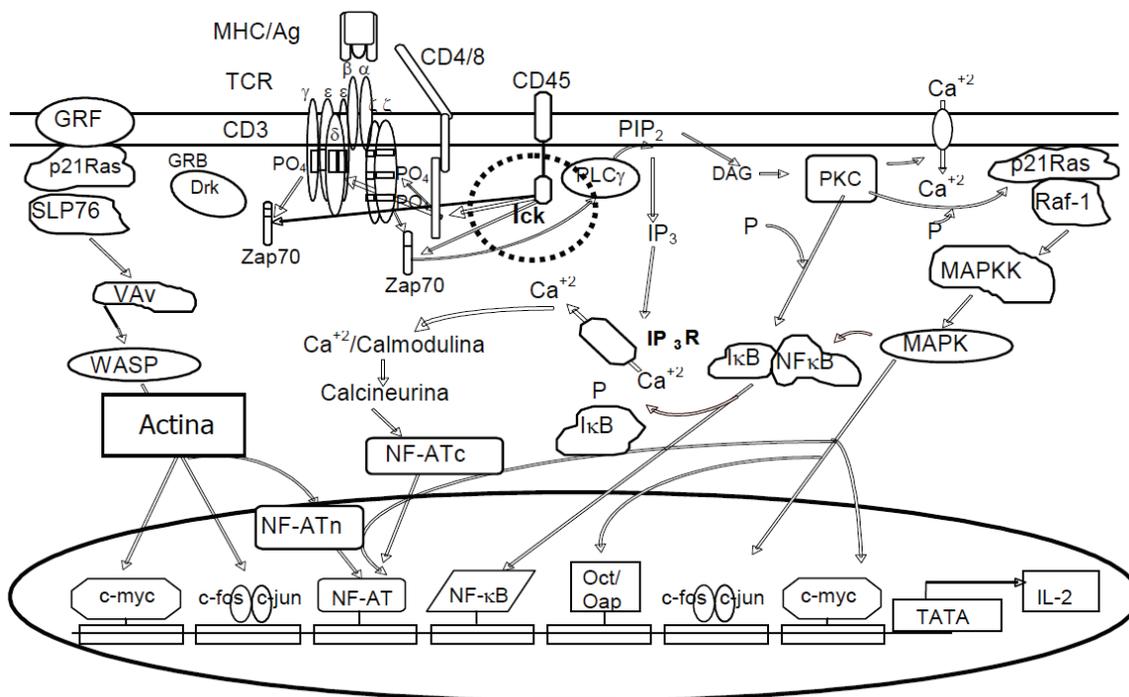


Figura 4. Esquema de la vía de activación de linfocitos T. La interacción de un Ag unido a una MHC con el TCR inicia una cascada de señalización con la activación de cinasas y pasos subsiguientes de fosforilación/desfosforilación de proteínas, se producen incrementos en calcio intracelular y se activan otras señales. CD; “Cluster” de diferenciación, PLC; Fosfolipasa C, PKC; Fosfoquinasa C, DAG; Diacilglicerol, NF; Factor nuclear, MAPK; Proteína cinasa activada por mitógenos.

Tabla III. Efectos de la exposición a iAs sobre señales intracelulares

Célula	Compuesto	Efecto (Incremento en)	Referencia
HeLa S3	NaAsO ₂ 50 μM	Actividad JNK2/1	[37]
Cl 41	As ³⁺ 200 μM	Actividad JNK y Erk1/2	[38]
CHO-k1	NaAsO ₂ 40 μM	Ca ²⁺ y actividad PKC	[39]
HEK 293	As ³⁺ 300 μM	Actividad JNK	[40]
BEAS 2B	NaAsO ₂ 500 μM	Fosforilación JNK y p38, actividad Erk2	[41]
T murinos	NaAsO ₂ 100 μM	Fosforilación JNK y p38, actividad Erk1/2	[42]

Algunos estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que la actividad inmunotóxica del iAs puede tener como blanco moléculas específicas (como STAT4 y STAT6) que regulan la diferenciación de las células T en dos subpoblaciones principales, las células CD4 (Th1) y CD8 (Th2) [36], y sobre moléculas que participan en la activación de la cascada de transducción de señales, tales como las MAPK, JNK y p38 [34]. Como se muestra en la figura 5, la expresión de las moléculas CD3, CD8 y CD4 se modifica, indicando que la velocidad de recambio de proteínas en la membrana se altera. Además, después de 24 horas de exposición, algunas células comienzan a expresar CD4 y CD8 al mismo tiempo, lo que generalmente es una señal de inmadurez de las células inmunes, impidiéndoles responder hacia un reto antigénico. Por otro lado, la cascada de señales de activación de las células T específicas inicia con la activación del TCR que se asocia a las moléculas CD3 (Fig. 4). Este complejo también se asocia con diferentes moléculas coestimuladoras como CD28, CD4 ó CD8. La formación de este

complejo induce la fosforilación de Ick (Fig. 4), la primera cinasa asociada al complejo y que desencadena la cascada de señales. En la figura 6 se muestra como el iAs induce un incremento sostenido de la fosforilación de Ick en ausencia de un estímulo mitogénico. Este fenómeno se asocia con la inducción de células apoptóticas que expresan la molécula Fas en su superficie (Fig. 7) ya que las células carecen del resto de los estímulos necesarios para responder adecuadamente. Al unirse la molécula Fas a su ligando (FasL) se inicia una cascada de señalización intracelular que invariablemente termina en apoptosis en la célula que responde al estímulo.

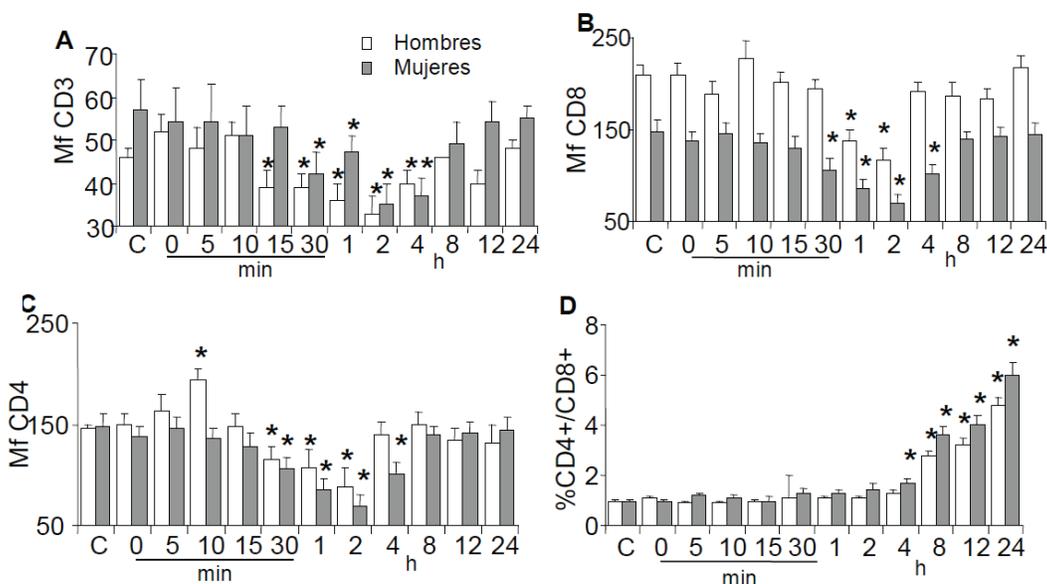


Figura 5. Cinética de expresión membranar del marcador de células T CD3 (A), CD8 (B), CD4 (C) en células mononucleadas de sangre periférica expuestas a 1 μ M de arsenito de sodio y la inducción de células dobles positivas CD4+/CD8+ después de 24 h de exposición (D). Mf; media de fluorescencia. * $p < 0.05$, t de Student.

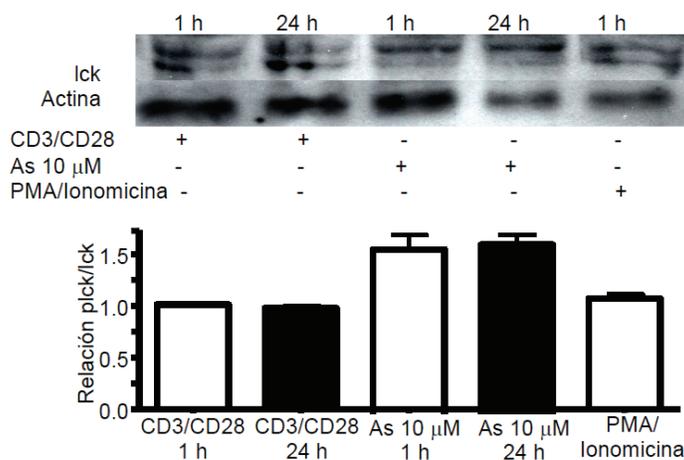


Figura 6. Fosforilación de Ick en células T expuestas a 10 μ M de iAs por 1 ó 24 h. Las dos bandas de Ick corresponden a proteínas con diferentes niveles de fosforilación ya que la proteína es susceptible de ser fosforilada en dos regiones distintas.

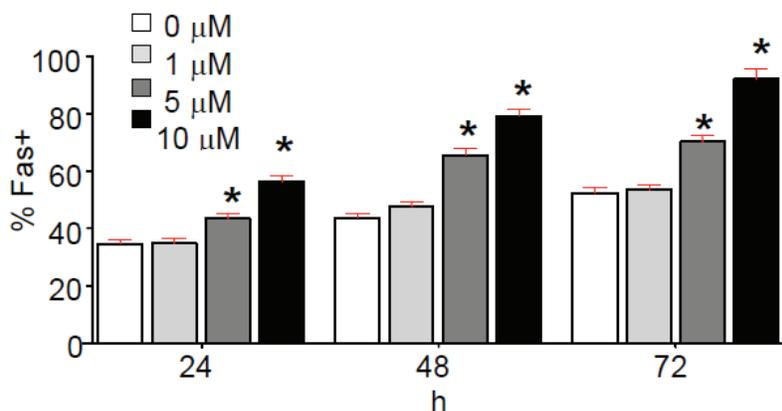


Figura 7. Expresión de Fas en células T expuestas a iAs por 24 h, * $p < 0.05$, t de Student.

Otros efectos sistémicos de la exposición a iAs

Además de los efectos genotóxicos, carcinogénicos e inmunotóxicos del iAs, se ha descrito que la exposición a iAs modifica la expresión de enzimas metabólicas como el citocromo P450 3A4 (CYP3A4) en un modelo animal (Fig. 8) [43], lo que a su vez afecta profundamente la respuesta inmune ya que se ha descrito que los CYP regulan la expresión y degradación de citocinas [44]. Estos estudios son relevantes puesto que la mayoría de los individuos expuestos a iAs presentan efectos en la salud que requieren medicación. Una gran proporción de dichos medicamentos requieren ser biotransformados por los CYP para ejercer su efecto o ser eliminados del organismo. Por lo tanto, si la exposición a iAs incrementa la incidencia de ciertas enfermedades que se tratan con medicamentos metabolizados por CYPs, algunos medicamentos no serán efectivos en los individuos creando un círculo de ineficacia en los pacientes y una tasa muy baja de éxito en el tratamiento de padecimientos.

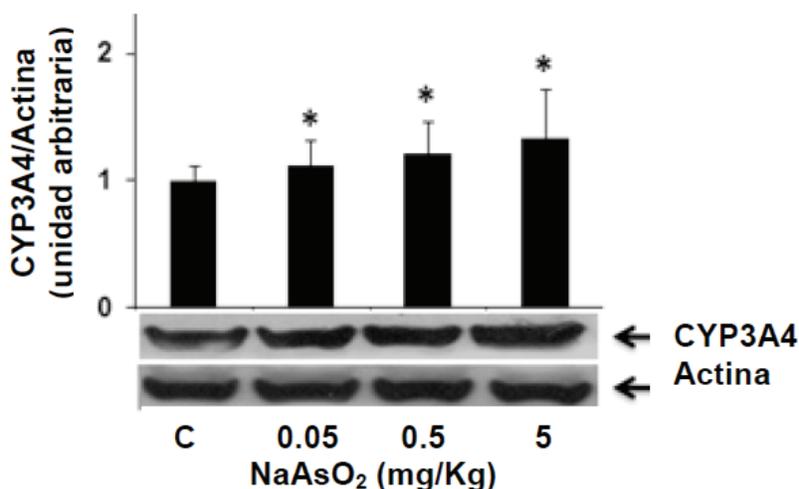


Figura 8. Cambios de la expresión relativa de CYP3A4 en relación con actina como control en intestino de ratones t3A4 expuestos a iAs por 24 h, * $p < 0.05$, t de Student [43].

Conclusiones

El arsénico es un metaloide que produce cáncer en el ser humano después de exposiciones muy prolongadas (entre 8 y 20 años). Existe una gran cantidad de personas en todo el mundo expuestas a este elemento, principalmente en el agua de bebida. Los mecanismos por los que el arsénico produce cáncer aún no son claros pero es evidente que es un elemento multifuncional ya que puede tener efectos variados dependiendo del tipo celular que se estudie. Uno de los mecanismos propuestos de la carcinogénesis del arsénico es su capacidad de modificar al sistema inmune, ya sea incrementando algunas respuestas (como la respuesta inflamatoria crónica por monocitos) como disminuyendo otras (como la respuesta inmune adquirida específica) causando inmunosupresión y favoreciendo la aparición de cáncer de piel. Los mecanismos de alteración inmunológica estudiados hasta ahora apuntan a que el arsénico puede fosforilar proteínas específicas que son importantes en la activación y diferenciación de células inmunes.

Referencias

1. Ghosh, P., Basu, A., Mahata, J., Basu, S., Sengupta, M., Das, J.K., Mukherjee, A., Sarkar, A.K., Mondal, L., Ray, K. y Giri, A.K. (2006) *Int. J. Cancer* **118**, 2470-2478
2. Heck, J.E., Gamble, M.V., Chen, Y., Graziano, J.H., Slavkovich, V., Parvez, F., Baron, J.A., Howe, G.R. y Ahsan, H. (2007) *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 1367-1374
3. Meza, M.M., Kopplin, M.J., Burgess, J.L. y Gandolfi, A.J. (2004) *Environ. Res.* **96**, 119-126
4. Vahter, M.E. (2007) *J. Nutr.* **137**, 2798-2804
5. Vahter, M., Akesson, A., Liden, C., Ceccatelli, S. y Berglund, M. (2007) *Environ. Res.* **104**, 85-95
6. Vega, L., Montes de Oca, P., Saavedra, R. y Ostrosky-Wegman, P. (2004) *Toxicology* **199**, 121-128
7. Mazumder, D.N. (2008) *Ind. J. Med. Res.* **128**, 436-447
8. Tchounwou, P.B., Wilson, B. e Ishaque, A. (1999) *Rev. Environ. Health* **14**, 211-229
9. Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., García-Vargas, G., Del Razo, L.M. y Cebrián, M.E. (1991) *Mutat. Res.* **250**, 477-483
10. Hurtado-Jiménez, R. y Gardea-Torresdey, J.L. (2006) *Rev. Panam. Salud Púb.* **20**, 236-247
11. Meza, M.M., Yu, L., Rodriguez, Y.Y., Guild, M., Thompson, D., Gandolfi, A.J. y Klimecki, W.T. (2005) *Environ. Health Perspect.* **113**, 775-781
12. Valenzuela, O.L., Germolec, D.R., Borja-Aburto, V.H., Contreras-Ruiz, J., García-Vargas, G.G. y Del Razo, L.M. (2007) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222**, 264-270
13. Gonsebatt, M.E., Vega, L., Salazar, A.M., Montero, R., Guzmán, P., Blas, J., Del Razo, L.M., García-Vargas, G., Albores, A., Cebrián, M.E., Kelsh, M. y Ostrosky-Wegman, P. (1997) *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **386**, 219-228
14. Coronado-González, J.A., Del Razo, L.M., García-Vargas, G., Sanmiguel-Salazar, F. y Escobedo-de la Peña, J. (2007) *Environ. Res.* **104**, 383-389
15. Rocha-Amador, D., Navarro, M.E., Carrizales, L., Morales, R. y Calderón, J. (2007) *Cad. Saude. Publica* **23**, S579-S587
16. Leke, R.J., Oduma, J.A., Bassol-Mayagoitia, S., Bacha, A.M. y Grigor, K.M. (1993) *Environ. Health Perspect.* **101**, 73-80
17. Vega, L., Gonsebatt, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. (1995) *Mutat. Res.* **334**, 365-373
18. Gonsebatt, M.E., Vega, L., Herrera, L.A., Montero, R., Rojas, E., Cebrián, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. (1992) *Mutat. Res.* **283**, 91-95
19. Gonsebatt, M.E., Vega, L., Montero, R., García-Vargas, G., Del Razo, L.M., Albores, A., Cebrián, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. (1994) *Mutat. Res.* **313**, 293-299
20. Andrew, A.S., Burgess, J.L., Meza, M.M., Demidenko, E., Waugh, M.G., Hamilton, J.W. y Karagas, M.R. (2006) *Environ. Health Perspect.* **114**, 1193-1198
21. Walter, I., Schwerdtle, T., Thuy, C., Parsons, J.L., Dianov, G.L. y Hartwig, A. (2007) *DNA Repair* **6**, 61-70
22. Chai, C.Y., Huang, Y.C., Hung, W.C., Kang, W.Y. y Chen, W.T. (2007) *Mutagenesis* **22**, 403-408
23. Menéndez, D., Mora, G., Salazar, A.M. y Ostrosky-Wegman, P. (2000) *Mutagenesis* **16**, 443-448
24. Conroy, H., Marshall, N.A. y Mills, K.H. (2008) *Oncogene* **27**, 168-180
25. Patterson, R., Vega, L., Bortner, C. y Germolec, D. (2004) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **199**, 434-443
26. Bourdonnay, E., Morzadec, C., Sparfel, L., Galibert, M.D., Jouneau, S., Martin-Chouly, C., Fardel, O. y Vernhet, L. (2009) *Mol. Immunol.* **46**, 649-656

27. Styblo, M., Del Razo, L.M., Vega, L., Germolec, D.R., LeCluyse, E.L., Hamilton, G.A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W.R. y Thomas, D.J. (2000) *Arch. Toxicol.* **74**, 289-299
28. Vega, L., Styblo, M., Patterson, R., Cullen, W., Wang, C. y Germolec, D. (2001) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172**, 225-232
29. Biswas, R., Ghosh, P., Banerjee, N., Das, J.K., Sau, T., Banerjee, A., Roy, S., Ganguly, S., Chatterjee, M., Mukherjee, A. y Giri, A.K. (2008) *Human & Exp. Toxicol.* **27**, 381-386
30. Soto-Peña, G.A., Luna, A.L., Acosta-Saavedra, L.C., Conde, P., López-Carrillo, L., Cebrián, M.E., Bastida, M., Calderón-Aranda, E.S. y Vega, L. (2006) *FASEB J.* **20**, 779-781
31. Huang, Y.C., Hung, W.C., Kang, W.Y., Chen, W.T. y Chai, C.Y. (2007) *Toxicol. Lett.* **173**, 57-65
32. Sakurai, T., Ohta, T., Tomita, N., Kojima, C., Hariya, Y., Mizukami, A. y Fujiwara, K. (2004) *Int. Immunopharmacol.* **4**, 1661-1673
33. Islam, L.N., Nabi, A.H., Rahman, M.M. y Zahid, M.S. (2007) *J. Environ. Sci. Health A Toxic Haz. Subs. Environ. Eng.* **42**, 1807-1814
34. Soto-Peña, G. y Vega, L. (2008) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **230**, 216-226
35. Vega, L., Soto, G., Luna, A., Acosta, L., Conde, P., Cebrián, M., Calderón, E., López, L. y Bastida, M. (2009) *Natural Arsenic in Groundwaters of Latin America*. AA Balkema Publishers (Taylor & Francis Group) Great Britain
36. Vega, L., Ostrosky-Wegman, P., Fortoul, T.I., Díaz, C., Madrid, V. y Saavedra, R. (1999) *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**, 203-220
37. Cavigelli, M., Li, W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K. y Karin, M. (1996) *EMBO J.* **15**, 6269-6279
38. Huang, C., Ma, W., Goranson, A. y Dong, Z. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 14595-14601
39. Liu, Y. y Huang, H. (1997) *J. Cell. Biochem.* **64**, 423-433
40. Porter, A., Fanger, G. y Vaillancourt, R. (1998) *Oncogene* **18**, 7794-7802
41. Samet, J.M., Graves, L.M., Quay, J., Dailey, L.A., Devlin, R.B., Ghio, A.J., Wu, W., Bromberg, P.A. y Reed, W. (1998) *Am. J. Physiol.* **275**, L551-L558
42. Hossain K, Akhand A.A., Kato M, Du J, Takeda K, Wu J, Takeuchi K, Liu W, Suzuki H. y Nakashima I. (2000) *J Immunol* **165**: 4290-4297
43. Medina-Díaz, I.M., Estrada-Muñiz, E., Reyes-Hernández, O.D., Ramírez, P., Vega, L. y Elizondo, G. (2009) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* doi:10.1016/j.taap.2008.11.009
44. Elizondo, G. y Vega, L. (2007) *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases*. Ed. Terrazas LI., Research Signpost, India

Semblanza de la Dra. Libia Vega Loyo



La Dra. Libia Vega Loyo es Bióloga de la Facultad de Ciencias de la UNAM (1991), realizó estudios de posgrado (Maestría en 1995 y Doctorado en 1998) en Investigación Biomédica Básica en la UNAM. Tiene un posdoctorado en el *National Institute of Environmental Health Sciences* de Carolina del Norte (EUA). Recibió el Premio Miguel Alemán en el área de Salud en 2008 por sus aportaciones al campo de la Toxicología Ambiental. Actualmente es Investigadora Titular 3C del CINVESTAV-IPN. Cuenta con 26 artículos internacionales indexados, 6 artículos en extenso en memorias nacionales e internacionales, 3 artículos de difusión, 7 capítulos

de investigación, 3 capítulos de revisión y 3 capítulos en libros de texto. Tiene más de 800 citas a sus trabajos, 140 presentaciones en congresos nacionales e internacionales. Tiene 5 tesis de Licenciatura, 6 tesis de Maestría y 1 tesis de Doctorado, actualmente dirige 1 tesis de Licenciatura, 1 tesis de Maestría y 3 tesis de Doctorado.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

PESTICIDAS ORGANOCLORADOS Y SUS EFECTOS EN LA ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA

Fabián Arechavaleta-Velasco, Laura Díaz-Cueto y Pablo Domínguez-López
Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva
Instituto Mexicano del Seguro Social
fabianj@unam.mx

Resumen

La síntesis y acción de las hormonas esteroides es fundamental para asegurar la homeostasis de cualquier organismo vivo y con esto evitar el desarrollo de diversas patologías. Sin embargo, hoy en día y debido a los cambios de nuestro hábitat, nos encontramos en contacto frecuente con sustancias químicas tanto naturales como sintéticas conocidas como disruptores endocrinos, que una vez incorporadas al organismo afectan el equilibrio hormonal. Los mecanismos mediante los cuales estos compuestos químicos afectan la función endocrina incluyen: 1) la simulación de la acción de la hormona, 2) la competencia por el receptor hormonal, 3) la modificación de la síntesis de la hormona o 4) la alteración de la expresión del receptor hormonal. Entre los ejemplos de disruptores endocrinos encontramos a los pesticidas organoclorados como el diclorodifeniltricloroetano y sus metabolitos. En este trabajo se describirán algunos de los principales mecanismos mediante los cuales estos pesticidas alteran la biosíntesis de los esteroides en los ovarios o su mecanismo de acción.

Palabras clave: Esteroidogénesis, hormonas esteroides, pesticidas organoclorados, ovario.

Abstract

Ovarian steroid production and subsequent steroid-mediated signaling controls a wide range of homeostatic processes. In contrast, dysregulated steroidogenesis and/or steroid signaling may cause systematic pathophysiological changes in the body. Endocrine disruptors represent one class of environmental agent that can affect the endocrine system of an organism in a wide variety of ways: 1) binding and activating the hormone receptor, 2) binding but not activating the hormone receptor, 3) modifying the synthesis of natural hormones or 4) altering the number of hormone receptors in a cell. Recognized examples of endocrine disruptors are the organochlorine pesticides as is dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites. This review discusses ovarian steroidogenesis and steroids function and how these processes are affected by organochlorine pesticides.

Keywords: Steroidogenesis, steroid hormones, organochlorine pesticides, ovary.

Introducción

Los ovarios son considerados los principales órganos reproductores femeninos ya que son esenciales para el almacenamiento y liberación de los óvulos, así como la producción de las principales hormonas sexuales femeninas. Desde el punto de vista funcional, los ovarios están constituidos por dos capas: la corteza que contiene folículos diferenciados, folículos quiescentes y ovocitos sometidos a procesos apoptóticos; y la médula, cuyas células se encargan de la producción de andrógenos. Es importante mencionar que para llevar a cabo sus funciones, el ovario se integra en un proceso cíclico y repetitivo de maduración folicular, ovulación, formación del cuerpo lúteo y finalmente la regresión de éste último, logrando con esto que se cumplan los dos objetivos principales de la función ovárica: (1) la generación de un óvulo fertilizable y (2) la preparación del endometrio para la implantación secuencial a través de la secreción cíclica de hormonas esteroides como son los estrógenos y la progesterona [1,2].

Ciclo ovárico

La producción de hormonas esteroides a partir del ovario comprende una unidad funcional constituida por el folículo, que desde su génesis está formado por una capa de células de la granulosa que rodean al ovocito, y que se encuentran a su vez separadas del estroma adyacente por una lámina basal. Este complejo denominado folículo primordial, sufre una serie de cambios morfológicos durante el proceso de foliculogénesis hasta convertirse en un folículo de *De Graaf* o dominante, en el que el ovocito ocupa una posición excéntrica rodeado de dos o tres capas de células de la granulosa, dando lugar al cúmulo oóforo, el cual está unido al resto de las células de la granulosa por uno de sus lados. Finalmente este complejo se encuentra rodeado de dos capas de células epiteliales denominadas células de la teca interna y externa (figura 1) [1-5].

Una vez conseguida la maduración total del folículo *De Graaf*, se produce su ruptura con la subsiguiente liberación del óvulo, proceso conocido como ovulación. Tras este proceso, tanto los capilares como los fibroblastos de la teca interna proliferan y penetran la lamina basal. Las células de la granulosa experimentan cambios morfológicos, que en su conjunto determinan el proceso de luteinización. Todas estas células de la granulosa transformadas, más las células de la teca y los vasos, se entremezclan para dar lugar al cuerpo lúteo [6-8].

Es importante mencionar que durante este proceso de maduración el folículo es la estructura encargada de sintetizar estrógenos, mientras que el cuerpo lúteo es el responsable de la producción de progesterona [2].

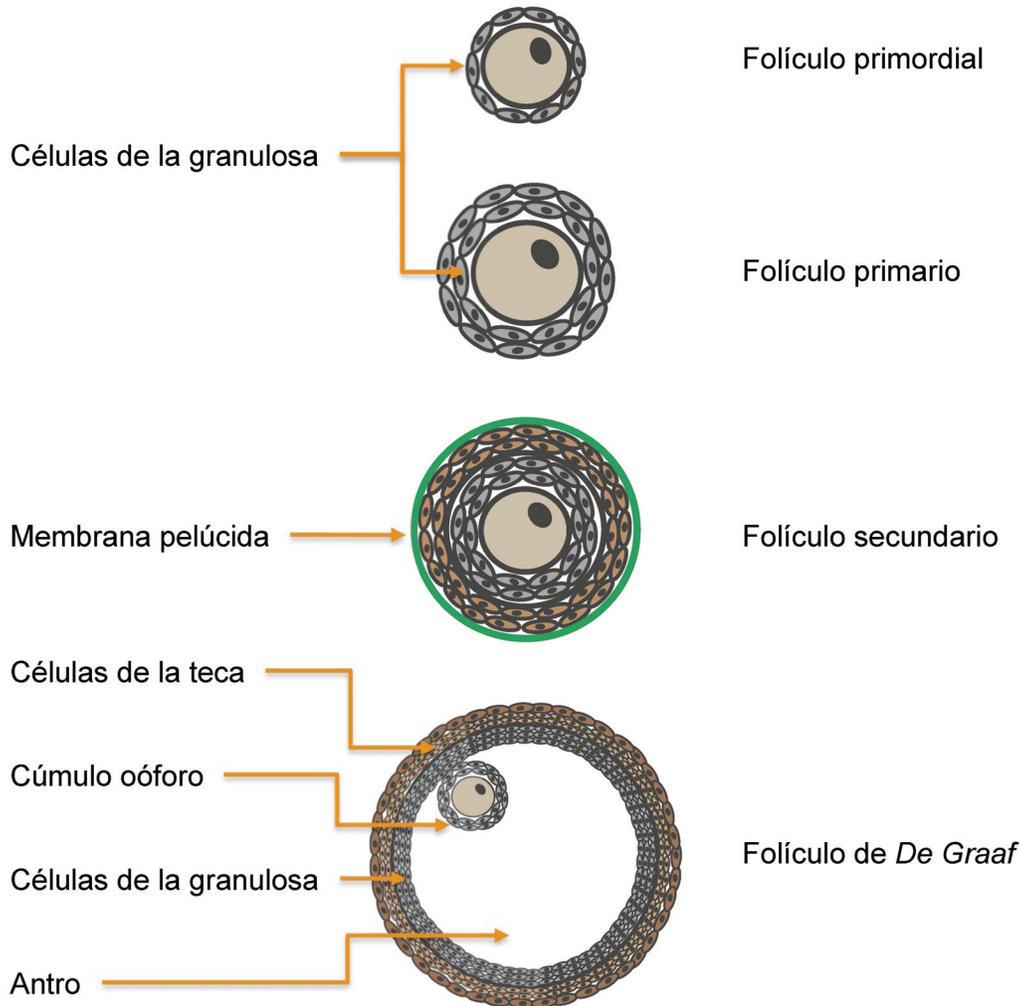


Figura 1. Crecimiento y desarrollo del folículo

Esteroidogénesis ovárica

Las rutas bioquímicas para la síntesis de hormonas esteroideas son similares en todos los tejidos esteroideogénicos como los ovarios, los testículos y las glándulas suprarrenales [2]. De manera general, las hormonas esteroideas se sintetizan a partir del colesterol que deriva de lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes en sangre, o bien de ésteres de colesterol almacenados en estos tejidos. El primer paso enzimático consiste en la conversión del colesterol en pregnenolona por medio de la enzima mitocondrial P450_{scc}, la cual elimina la cadena alifática del colesterol como ácido hipocaproico. Esta reacción es considerada como el paso limitante en el proceso biosintético y está controlado principalmente por la hormona luteinizante (LH) [9-12]. La pregnenolona formada ahora puede ser convertida en progesterona o en 17 α -hidroxipregnenolona por la acción del complejo enzimático 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y

$\Delta^{4,5}$ cetoesteroide isomerasa, el cual utiliza NAD^+ como aceptor de electrones y cambia el doble enlace de la posición Δ^5 a la posición Δ^4 [13].

En general la progesterona es secretada por las células, sin embargo ésta también puede ser precursor para la síntesis de andrógenos y estrógenos, ya que puede ser convertida en 17α -hidroxiprogesterona por la enzima P450c17, la cual presenta actividad de 17α -hidroxilasa y $17,20$ liasa [9,14,15].

Por otra parte, la P450c17 también convierte a la 17α -hidroxipregnenolona en dehidroepiandrosterona (DHEA), la cual puede a su vez transformarse en androstenediona por la acción del complejo enzimático 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y $\Delta^{4,5}$ cetoesteroide isomerasa. Cabe mencionar que esta es la principal vía de síntesis de andrógenos en el ovario y que aunque se secretan principalmente como androstenediona, el ovario también es capaz de liberar cantidades pequeñas de DHEA y testosterona [9, 13].

En lo que se refiere a la síntesis de estradiol, el estrógeno más activo producido en el ovario, éste es elaborado a partir de los andrógenos por la enzima P450 aromatasa, la cual primero hidroxila al grupo metilo en el carbono 19, para posteriormente oxidarlo e hidroxilarlo en la posición 3α (figura 2) [9,16,17].

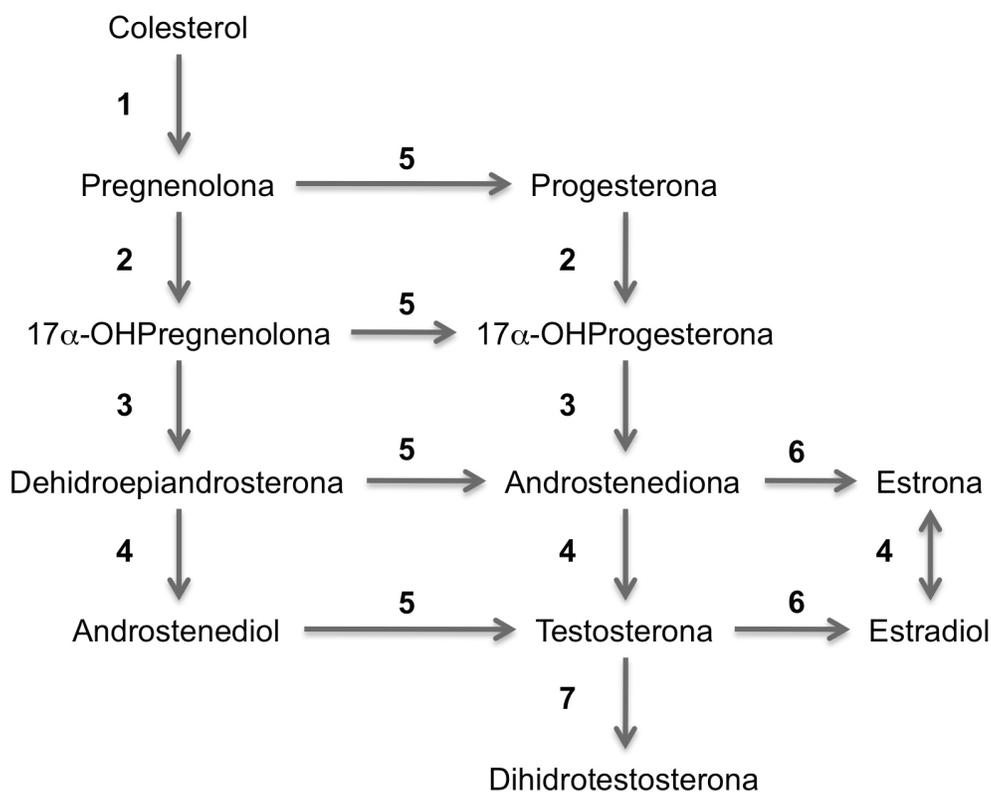


Figura 2. Biosíntesis de hormonas esteroides en el ovario. (1) P450scc, (2) P450c17 (17α -hidroxilasa), (3) P450c17 ($17,20$ liasa), (4) 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y $\Delta^{4,5}$ cetoesteroide isomerasa, (5) 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y $\Delta^{4,5}$ cetoesteroide isomerasa, (6) P450 aromatasa, (7) 5α -reductasa.

Es importante mencionar que debido a la expresión diferencial de las enzimas esteroidogénicas en el ovario, la producción de estrógenos requiere de la interacción entre las células de la teca y las células de la granulosa, ya que las primeras, con suficiente vascularización y receptores para LDL, disponen de los sistemas enzimáticos capaces de transformar la pregnenolona en andrógenos, pero en contraste no tienen las enzimas aromatizantes para llegar a la biosíntesis del estradiol. Por su parte, las células de la granulosa tienen poco acceso al colesterol-LDL, lo que disminuye su capacidad de biosintetizar pregnenolona y progesterona. Sin embargo estas células son capaces de sintetizar cantidades elevadas de estrógenos, siempre y cuando los andrógenos precursores les sean suministrados por las células de la teca (Figura 3) [18].

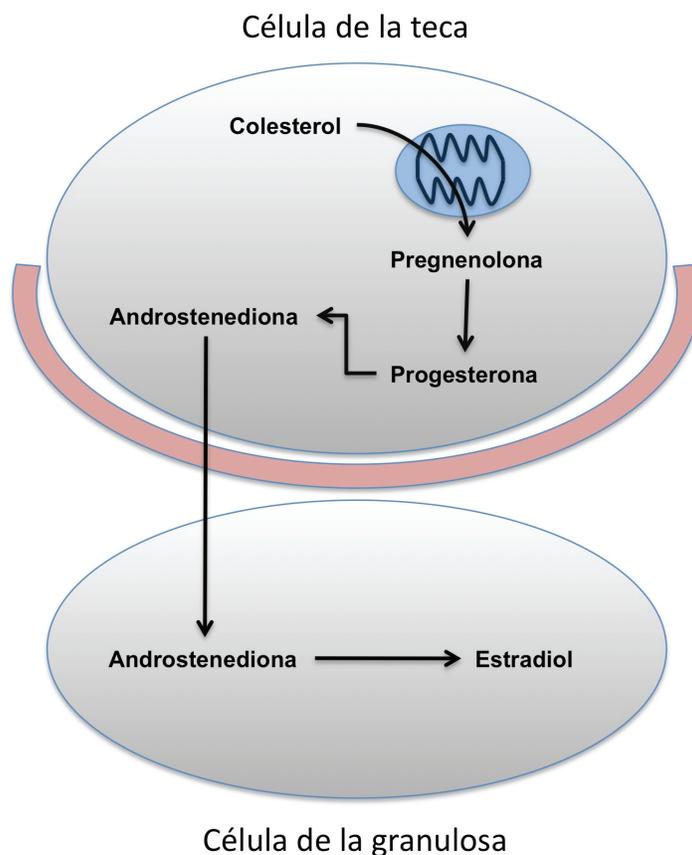


Figura 3. Interacción entre las células de la teca y de la granulosa en la biosíntesis de estrógenos.

Acciones fisiológicas de las hormonas esteroides

Estrógenos

Los estrógenos ejercen múltiples acciones tanto en órganos del sistema reproductivo como en otros sistemas corporales. Por ejemplo, durante la pubertad estimulan el desarrollo de los caracteres sexuales femeninos, induciendo el crecimiento mamario, la distribución característica de la grasa corporal predominantemente alrededor de muslos y caderas y el desarrollo de genitales internos y externos. Además, los estrógenos inducen la proliferación del endometrio al estimular la mitosis del estrato basal y la angiogénesis del estrato funcional.

También en el útero los estrógenos aumentan los receptores de oxitocina así como la producción de moco cervical acuoso. En el ovario su efecto principal es el incremento de la mitosis en las células de la granulosa; mientras que en la glándula mamaria los estrógenos estimulan el crecimiento y diferenciación del epitelio ductal, inducen actividad mitótica de las células cilíndricas ductales y estimulan el crecimiento del tejido conectivo. En lo que respecta al hígado, los estrógenos modulan la expresión de genes de apoproteína y aumentan la síntesis del receptor de lipoproteína, lo que resulta en una disminución de las concentraciones séricas de colesterol total y colesterol de lipoproteína de baja densidad, pero provoca un aumento del colesterol de lipoproteínas de alta densidad y triglicéridos. Por otra parte, los estrógenos regulan la expresión hepática de genes relacionados con la fibrinólisis y la coagulación. En el sistema nervioso central, los estrógenos ejerce efectos neuroprotectores y su disminución, vinculada con la edad, se relaciona con declinación en la función cognitiva. En lo que respecta al hueso, los efectos estrogénicos son antirresortivos, ya que promueven la maduración ósea y el cierre de placas epifisarias en huesos largos; conservando la masa ósea al suprimir el recambio óseo y manteniendo los índices equilibrados de formación y resorción óseas [19-23].

Progesterona

En general, la progesterona prepara el tracto reproductor para el inicio y mantenimiento del embarazo. Las principales acciones fisiológicas de la progesterona están mediadas en el útero y el ovario, donde estimula la liberación de ovocitos maduros, facilita la implantación del blastocito y mantiene el embarazo al estimular el crecimiento y la diferenciación uterina, así como por supresión de la contractilidad miometrial [24].

De manera particular, en el útero, la progesterona induce la diferenciación de las células del estroma, estimula las secreciones glandulares a partir de las células endometriales, y modula la proliferación cíclica durante el ciclo menstrual. Además, la progesterona desempeña un papel importante en la preparación del endometrio para la implantación del huevo fertilizado, ya que promueve la síntesis de enzimas responsables para la lisis de la zona pelúcida. También la progesterona induce la quiescencia del miometrio al aumentar el potencial de membrana en reposo y evitar el acoplamiento eléctrico entre células miometriales; además, disminuye la captación del calcio extracelular requerido para la contracción de células miometriales mediante la regulación a la baja de la expresión de genes que codifican subunidades de canales de calcio dependientes de voltaje. La progesterona también evita las contracciones uterinas al bloquear la capacidad del estradiol para inducir la expresión de los receptores α -adrenérgicos. Otro mecanismo utilizado por la progesterona para inhibir las contracciones uterinas consiste en disminuir la síntesis de prostaglandina y aumentar su índice de inactivación mediante la estimulación de prostaglandina 15-deshidrogenasa. Asimismo, contrarresta los efectos estimuladores del estrógeno en la expresión endometrial de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ en la fase lútea del ciclo menstrual. Finalmente, la progesterona mantiene los niveles de relaxina, hormona que inhibe la contracción espontánea del miometrio contribuyendo con esto a la desensibilización del útero. Por otra parte, la progesterona estimula el desarrollo lóbulo-alveolar en la glándula mamaria como preparación para la secreción de leche durante la lactancia, sin embargo esta hormona contrarresta los efectos de la prolactina en las fases media y tardía del embarazo, para suprimir la síntesis de la proteína láctea durante el embarazo. Cabe mencionar que el súbito descenso de progesterona circulante que ocurre con el parto, se relaciona con aumento concomitante de secreción de prolactina y con el inicio de la lactancia [24-27].

Es un hecho que las hormonas esteroideas juegan un papel fundamental en la homeostasis de organismo humano femenino, es por eso que cualquier alteración en su secreción o acciones pueden modificar este equilibrio y por lo tanto inducir cambios fisiológicos que culminen con patologías tales como cáncer, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, alteraciones del ciclo menstrual, infertilidad y pérdidas fetales recurrentes o abortos.

Pesticidas organoclorados y la esteroidogénesis

El diclorodifeniltricloroetano o DDT es un insecticida organoclorado sintético cuyo uso principal es el control del paludismo a través del exterminio de los mosquitos vectores. En México su uso como plaguicida y control del paludismo fue indiscriminado entre los años de 1971 a 1993, período en el cual se utilizaron 226,000 toneladas de este insecticida. En el año de 1999 el gobierno mexicano decidió sustituir al DDT por otro plaguicida/insecticida de menor toxicidad denominado deltametrina. Sin embargo, dada la estructura química del DDT y su vida media que se ha calculado entre 5 a 30 años, la población mexicana tendrá una alta concentración sistémica de este insecticida por un tiempo prolongado, por lo que este compuesto químico es considerado como un problema toxicológico real en México [28-31].

El grado técnico del DDT en realidad es una mezcla de tres isómeros de DDT, el principal es el *p,p'*-DDT (85%), mientras que los isómeros *o,p'*-DDT y *o,o'*-DDT se presentan en cantidades mucho menores [28]. En los sistemas animales el DDT y sus isómeros se transforman lentamente a 1,1-dicloro-2,2-bis (4-diclorodifenil)-eteno (DDE) y a 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano (DDD). Estos metabolitos, al igual que el compuesto original son capaces de almacenarse en tejido adiposo, presentando características toxicológicas similares [28, 30-33].

El DDT y sus metabolitos están considerados dentro del grupo de compuestos llamados disruptores endocrinos, ya que por su estructura química son capaces de alterar la acción de las hormonas esteroides como los estrógenos y progesterona. Los mecanismos mediante los cuales estos compuestos afectan la función endocrina incluyen: 1) la simulación de la acción de la hormona (agonista), 2) la competencia por el receptor hormonal (antagonista), 3) la modificación de la síntesis de la hormona o 4) la alteración de la expresión del receptor hormonal [34].

En cuanto al efecto sobre la progesterona se ha demostrado que existen dos formas principales de cómo el DDT afecta su función. La primera involucra la síntesis de la hormona mientras que la segunda se relaciona con la función de la misma. En lo referente a la producción de la progesterona, en estudios *in vitro* se observó que tanto el DDE como el DDT disminuyen la síntesis de esta hormona tanto en células del cumulus como en una línea celular proveniente de células de la granulosa. Asimismo, en este estudio se mostró que el mecanismo que opera en dicha reducción es mediante la disminución en la concentración de AMPc y la expresión de la enzima P450_{sc}, la cual convierte al colesterol en pregnenolona como paso previo a la síntesis de progesterona [35, 36]. En cuanto a la función de la hormona, se ha demostrado la unión de los metabolitos *o,p'*-DDE y *p,p'*-DDE al receptor de progesterona (RP) en diversas especies animales, incluyendo patos, gallinas, conejos [37], lagartos [38] y más recientemente ovocitos de peces [39]. El hecho de que exista una unión entre los metabolitos del insecticida y el RP no implica una funcionalidad, sin embargo, estudios realizados *in vitro*, han demostrado un efecto antagonista. Por ejemplo, en sistemas *in vitro* con células humanas y levaduras, se observó que el DDT y sus metabolitos disminuyen la expresión de genes que contienen los elementos de respuesta a la progesterona [40, 41] (Tabla I).

En lo que respecta al estradiol, el DDT presenta efectos duales, ya que dependiendo del isómero se pueden inducir efectos estrogénicos o anti-estrogénicos, es decir, el *p,p*-DDT disminuye la síntesis de esta hormona, mientras que el *o,p*-DDT incrementa su producción en co-cultivos de células de la granulosa y células de la teca provenientes de folículos obtenidos de ganado porcino. En contraste, los isómeros de DDE solamente inducen un aumento en la síntesis de estradiol en el mismo modelo experimental. El mecanismo molecular mediante el cual el DDT y DDE incrementan la síntesis de estradiol es a través del aumento de la actividad de la enzima P450_{aromatasa}, la cual convierte a la testosterona en estradiol [42, 43]. Finalmente, en lo que se refiere a la unión con el receptor de estrógenos, el DDT y DDE presentan una actividad agonista, por lo que se consideran como xenoestrógenos (Tabla I) [43, 44].

Tabla I. Efectos del DDT y sus metabolitos sobre la síntesis de estradiol y progesterona.

Metabolito	E2	P4	AMPc	P450scc	Aromatasa
DDT	↓↑*	↓			↑
DDE	↑	↓	↓	↓	↑
DDD	↑				

E2, Estradiol; P4, Progesterona; * Depende del isómero

Consideraciones finales

Las dos últimas décadas han sido testigo de la creciente preocupación científica y el debate público acerca de los efectos adversos potenciales que pueden resultar de la exposición a un grupo de sustancias químicas que tienen la capacidad de alterar el funcionamiento normal del sistema endocrino en la vida silvestre y seres humanos. Más aún, estos compuestos, también llamados disruptores endocrinos, no sólo modulan al sistema endocrino, sino que además afectan al sistema inmune, el desarrollo y el comportamiento de los individuos expuestos, e igualmente tienen efectos sobre los tejidos reproductivos masculino y femenino, la fertilidad, la función tiroidea y el sistema nervioso central. Entre los efectos potenciales de estas sustancias cabe mencionar los siguientes: anomalías intrauterinas por daños del tejido fetal en formación, cambios del fenotipo genital al nacer y diversas manifestaciones clínicas durante la adolescencia; además, no pueden perderse de vista los efectos sobre las generaciones futuras.

Un ejemplo de estos disruptores endocrinos es el DDT, que fue utilizado ampliamente durante los años 70's, y que hoy en día comienza a reutilizarse a nivel mundial y nacional para el control de la malaria. En relación a este pesticida, es importante mencionar que los estudios sobre los efectos inducidos en seres humanos han generado, en general, resultados inconclusos e inconsistentes y la información obtenida ha sido calificada de "débil". Esta calificación no minimiza los efectos potenciales de este compuesto y sus metabolitos sino que pone de relevancia la necesidad de efectuar estudios más rigurosos.

Más aún, los mecanismos de acción tóxica por los cuales este compuesto y sus metabolitos interfieren con la función endocrina, específicamente con la esteroidogénesis ovárica, es un área relativamente inexplorada, por lo tanto es necesario continuar o comenzar con estudios encaminados a dilucidar el conocimiento detallado de dichos mecanismos para poder evaluar correctamente los riesgos de la exposición al DDT y sus metabolitos.

Referencias

- Gougeon, A. (2004) in *The ovary* (Leung, P. C. K. and Adashi, E. Y., eds.) pp. 25-44, Elsevier Academic Press, San Diego
- Speroff, L. and Fritz, M. A. (2005) *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Anderson, L. D. and Hirshfield, A. N. (1992) *Md Med J* **41**, 614-620
- Hirshfield, A. N. (1991) *Int. Rev. Cytol.* **124**, 43-101
- Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M. and Eppig, J. J. (2002) *Science* **296**, 2178-2180
- Espey, L. L., Bellinger, A. S. and Healy, J. A. (2004) in *The ovary* (Leung, P. C. K. and Adashi, E. Y., eds.) pp. 25-44, Elsevier Academic Press, San Diego
- Murphy, B. D. (2004) in *The ovary* (Leung, P. C. K. and Adashi, E. Y., eds.) pp. 25-44, Elsevier Academic Press, San Diego
- Stouffer, R. L. (2004) in *The ovary* (Leung, P. C. K. and Adashi, E. Y., eds.) pp. 25-44, Elsevier Academic Press, San Diego

9. Payne, A. H. and Hales, D. B. (2004) *Endocr. Rev.* **25**, 947-970
10. Simpson, E. R. (1979) *Mol. Cell. Endocrinol.* **13**, 213-227
11. Vickery, L. E. (1997) *Steroids* **62**, 124-127
12. Ho, C. K. M., Christenson, L. K. and Strauss, J. F. I. I. (2004) in *The ovary* (Leung, P. C. K. and Adashi, E. Y., eds.) pp. 25-44, Elsevier Academic Press, San Diego
13. Thomas, J. L., Duax, W. L., Addlagatta, A., Kacsoh, B., Brandt, S. E. and Norris, W. B. (2004) *Mol. Cell. Endocrinol.* **215**, 73-82
14. Nakajin, S. and Hall, P. F. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 3871-3876
15. Nakajin, S., Shively, J. E., Yuan, P. M. and Hall, P. F. (1981) *Biochemistry* **20**, 4037-4042
16. Graham-Lorence, S., Khalil, M. W., Lorence, M. C., Mendelson, C. R. and Simpson, E. R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11939-11946
17. Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M. D. and et, a. (1994) *Endocr. Rev.* **15**, 342-355
18. Jammongjit, M. and Hammes, S. R. (2006) *Cell Cycle* **5**, 1178-1183
19. Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. and Huber, J. C. (2002) *N. Engl. J. Med.* **346**, 340-352
20. Simoncini, T., Mannella, P. and Genazzani, A. R. (2006) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1089**, 424-430
21. Stice, J. P. and Knowlton, A. A. (2008) *Mol. Med.* **14**, 517-527
22. Suzuki, S., Brown, C. M. and Wise, P. M. (2006) *Endocrine* **29**, 209-215
23. Zouboulis, C. C., Chen, W. C., Thornton, M. J., Qin, K. and Rosenfield, R. (2007) *Horm Metab Res* **39**, 85-95
24. Graham, J. D. and Clarke, C. L. (1997) *Endocr. Rev.* **18**, 502-519
25. Arck, P., Hansen, P. J., Mulac Jericevic, B., Piccinni, M. P. and Szekeres-Bartho, J. (2007) *Am J Reprod Immunol* **58**, 268-279
26. Mesiano, S. (2007) *Semin Reprod Med* **25**, 5-13
27. Schumacher, M., Sitruk-Ware, R. and De Nicola, A. F. (2008) *Curr Opin Pharmacol* **8**, 740-746
28. Faroon, O., Harris, M. O., Lladós, F., Swarts, S., Sage, G., Citra, M. and Gefell, D. (2002) *Toxicological profile for DDT, DDE, DDD*, Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (ATSDR). US Public Health Service, Atlanta
29. Lopez-Carrillo, L., Torres-Arreola, L., Torres-Sanchez, L., Espinosa-Torres, F., Jimenez, C., Cebrian, M., Waliszewski, S. and Saldate, O. (1996) *Environ Health Perspect* **104**, 584-588
30. Longnecker, M. P., Rogan, W. J. and Lucier, G. (1997) *Annu Rev Public Health* **18**, 211-244
31. Turusov, V., Rakitsky, V. and Tomatis, L. (2002) *Environ Health Perspect* **110**, 125-128
32. Waliszewski, S. M., Aguirre, A. A., Infanzon, R. M., Benitez, A. and Rivera, J. (1999) *Bull Environ Contam Toxicol* **62**, 685-690
33. Waliszewski, S. M., Aguirre, A. A., Infanzon, R. M., Silva, C. S. and Siliceo, J. (2001) *Arch Environ Contam Toxicol* **40**, 432-438
34. Henley, D. V. and Korach, K. S. (2006) *Endocrinology* **147**, S25-32
35. Crellin, N. K., Kang, H. G., Swan, C. L. and Chedrese, P. J. (2001) *Reproduction* **121**, 485-492
36. Jorge Chedrese, P. and Feyles, F. (2001) *Reprod Toxicol* **15**, 693-698
37. Lundholm, C. E. (1988) *Comp Biochem Physiol C* **89**, 361-368
38. Vonier, P. M., Crain, D. A., McLachlan, J. A., Guillette, L. J., Jr. and Arnold, S. F. (1996) *Environ Health Perspect* **104**, 1318-1322
39. Das, S. and Thomas, P. (1999) *Endocrinology* **140**, 1953-1956
40. Klotz, D. M., Ladlie, B. L., Vonier, P. M., McLachlan, J. A. and Arnold, S. F. (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* **129**, 63-71
41. Chatterjee, S., Kumar, V., Majumder, C. B. and Roy, P. (2008) *Toxicol In Vitro* **22**, 788-798
42. Gregoraszcuk, E. L., Rak, A., Kawalec, K. and Ropstad, E. (2008) *Toxicol Lett* **178**, 103-109
43. Wojtovicz, A. K., Kajta, M. and Gregoraszcuk, E. L. (2007) *J. Physiol. Pharmacol.* **58**, 873-885
44. Li, J., Li, N., Ma, M., Giesy, J. P. and Wang, Z. (2008) *Toxicol Lett* **183**, 65-71

Semblanza del Dr. Fabián Arechavaleta-Velasco



El Dr. Fabián Arechavaleta-Velasco nació obtuvo su título de Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los grados de Maestría y Doctorado en Ciencias los obtuvo en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). En el 2000 fue premiado con una beca *Fogarty Internacional Center/National Institutes of Health (NIH)* para realizar una estancia postdoctoral en el “*Center for Research on Reproduction and Women’s Health*”, *University of Pennsylvania, Philadelphia, USA*. Actualmente es Investigador Asociado en la Unidad de Investigación en Medicina

Reproductiva, UMAE en Ginecología y Obstetricia del IMSS. Asimismo es Investigador Nacional Nivel I. Además es profesor de asignatura de la materia de fisiología en la Facultad de Medicina de la UNAM. Cuenta con 23 publicaciones en revistas indexadas, 1 capítulo de libro y 231 citas a sus publicaciones. Entre sus reconocimientos, el Dr. Fabian Arechavaleta Velasco ha sido distinguido con el premio “SGL President’s Presenter Award otorgado por la Society for Gynecologic Investigation; Premio a la Tesis del Año en Nutrición 2002 otorgado por el Fomento de Nutrición y Salud, A. C. y el Premio de Investigación sobre Defectos al Nacimiento otorgado por el Grupo de Estudios del Nacimiento, A. C. La investigación en su laboratorio esta encaminada a entender el efecto tóxico de los pesticidas sobre el trofoblasto humano y las implicaciones de este daño en la salud materno-fetal. Por otra parte, en su laboratorio también se realizan estudios de la asociación genética con patologías gineco-obstetricas tal como el parto pretérmino y la vaginosis bacteriana.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

SEÑALES MOLECULARES QUE MODULAN EL METABOLISMO ENERGÉTICO: IMPLICACIONES EN EL DESARROLLO DE OBESIDAD, DIABETES Y CARDIOPATÍAS

Karla G Carvajal Aguilera y Silvia Carrillo Sánchez
Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría
Insurgentes sur 3700, México D.F.
karla_ca@yahoo.com

Resumen

El síndrome metabólico comprende varias manifestaciones clínicas como resistencia a la insulina, dislipidemias (hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hipoalfalipoproteinemia), obesidad abdominal e hipertensión arterial entre otras. Constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, por lo que se considera un problema de salud pública en México y muchas partes del mundo. Las alteraciones endocrino-metabólicas asociadas al síndrome metabólico implican la participación de factores ambientales y genéticos, los cuales llevan a un desequilibrio en el metabolismo energético celular, particularmente en la degradación y utilización de lípidos y carbohidratos. Sin embargo, no se conoce a ciencia cierta qué mecanismos celulares están implicados en el desarrollo de esta perturbación energética, ni cómo los factores ambientales pueden modificar la expresión de genes que regulan la economía energética a nivel celular y del organismo completo. Se han identificado varios sistemas claves en el control de las enzimas que modulan la homeostasis energética celular: la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), los receptores nucleares activados por proliferadores de los peroxisomas (PPARs), la leptina y la adiponectina. A pesar del intenso estudio que se lleva a cabo sobre estas proteínas, aún no queda claro cómo participa cada una en el control energético de la célula, ni la interrelación que existe entre ellas para establecer una red de señalización energética celular. En este trabajo analizamos la participación de las señales energéticas que participan en el metabolismo energético y cómo pueden interactuar para formar una red controladora del consumo y producción de energía.

Palabras clave: Síndrome metabólico, AMPK, PPARs, leptina, adiponectina, metabolismo energético.

Abstract

Metabolic syndrome comprises insulin resistance, dyslipidemias such as hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia, visceral obesity and hypertension, among others. It is considered an important cardiovascular risk factor and thereby a priority wide world health problem. Some key cellular signals have been identified as control points in energy cell balance by modulating protein expression and post-transcriptional enzymatic regulation: AMP-activated protein kinase (AMPK) is a metabolic cellular gauge, with leptin, adiponectin and the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), AMPK participates in metabolic energy balance by controlling activation and expression of key enzymes. They constitute thereby an important energy signaling pathway. How these components interact has not been established, and the energy deficit associated with metabolic disturbances (dyslipidemias, diabetes, and some cardiomyopathies), may lie on the perturbation of such signaling cascade. We aimed to understand the role of this pathway in cellular energy balance, as well as the role on the onset of the energy deficit in metabolic syndrome.

Keywords: Metabolic syndrome, AMPK, PPARs, leptin, adiponectin, energy metabolism.

Introducción

El síndrome metabólico es una patología heterogénea cuyas manifestaciones clínicas incluyen resistencia a la insulina, dislipidemias (hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hipoalfalipoproteinemia), obesidad abdominal e hipertensión arterial, entre otras [1]. Es considerado un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, constituyendo así un importante problema de salud pública en México y en muchas partes del mundo [2].

La patogénesis del síndrome metabólico es compleja y deja claro que en ella intervienen tanto factores genéticos como ambientales, particularmente aquéllos que impactan sobre el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos. En este sentido, se ha propuesto que la inactividad física promueve el desarrollo de obesidad y disminuye la sensibilidad a insulina en el músculo; así también, las dietas con alto contenido en grasas y carbohidratos favorecen el desarrollo del síndrome metabólico y contribuyen al desarrollo de hipertensión arterial y obesidad. A nivel genético, la identificación del gen de la leptina como el factor causante de obesidad y diabetes tipo II, así como la asociación de algunos alelos del gen PPAR que codifica para la isoforma γ , con el desarrollo de resistencia a insulina y diabetes tipo II, ilustran claramente que existen señales celulares que responden a factores ambientales y controlan la homeostasis energética a diferentes niveles celulares [3]. Sea cual sea el o los factores involucrados, el denominador común es un desequilibrio en la producción y utilización de energía, que a largo plazo compromete la función de órganos y funciones vitales [4]. Sin embargo, los mecanismos celulares y bioquímicos involucrados en el desarrollo del desequilibrio metabólico que acompaña al síndrome metabólico no han sido esclarecidos con detalle [3].

El balance entre la producción y utilización de energía recae sobre varios sistemas celulares, los cuales responden tanto a las condiciones ambientales como a la carga genética del organismo. Hasta ahora se han identificado varios sistemas claves en el control de las enzimas que modulan la homeostasis energética celular: la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) [5], los receptores nucleares activados por proliferadores de los peroxisomas (PPARs) [6,7], la leptina y la adiponectina [8,9]. A pesar del intenso estudio que se lleva a cabo sobre estas

proteínas, aún no queda claro cómo participa cada una en el control energético de la célula, ni la interrelación que existe entre ellas para establecer una red de señalización energética celular [10,11]. Sin embargo, es claro que esta red opera de manera coordinada e integral, a través de la comunicación entre varios órganos incluyendo el tejido adiposo, el cual actúa más allá de un simple reservorio de lípidos, el hígado y el tejido muscular, tanto esquelético como cardíaco.

En este trabajo describimos los diferentes factores que han sido identificados como moduladores del balance energético y su intercomunicación como componentes de una red de señalización que sirve como intermediario entre las señales ambientales y la carga genética del organismo. Así mismo, discutiremos cómo la perturbación de este sistema puede conducir al desarrollo de patologías como obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares.

Proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK)

La AMPK es un sensor del estado nutricional y metabólico de la célula. Es una proteína cinasa de Ser/Thr compuesta por tres subunidades, dos de ellas, la β y γ actúan como elementos regulatorios mientras que la subunidad α es la unidad catalítica. Las diferentes isoformas de cada subunidad se expresan de manera tejida específica. En el corazón de los mamíferos, la principal subunidad catalítica es la isoforma $\alpha 2$ [5]. Esta cinasa puede activarse por ejercicio, estrés osmótico, isquemia e hipoxia al fosforilarse la subunidad catalítica. A su vez, esta activación promueve la fosforilación de enzimas claves del metabolismo energético que intensifican la producción de ATP y disminuye los procesos que lo consumen (Fig. 1). Se sabe que ciertas citocinas como la leptina y la adiponectina pueden activar a la AMPK, sin embargo los mecanismos que conllevan a este evento no son claros [12]. De manera interesante, se ha propuesto a la AMPK como uno de los blancos terapéuticos de la metformina, y como el responsable del efecto antidiabético de este fármaco.

El principal mecanismo regulador de la activación de la AMPK involucra la fosforilación de la Thr172 de la subunidad catalítica α por una cinasa superior en la vía, la AMPK cinasa (AMPKK). Adicionalmente, esta activación se intensifica alostéricamente por un aumento en la relación AMP/ATP. La acidosis celular se ha propuesto también como un potente activador de la enzima [5]. En este sentido, los cambios metabólicos inducidos por la isquemia (disminución de ATP y PCr, aumento de AMP y acidosis) establecen las condiciones óptimas para la activación de la AMPK. La activación de la enzima desencadena las diferentes respuestas celulares al fosforilar diversas enzimas claves en las vías metabólicas. Promueve la síntesis de ATP e inhibe los procesos que lo consumen, se piensa también que la activación de la AMPK regula a largo plazo la transcripción nuclear, la transferencia de energía y las vías de señalización. Así, la AMPK se sitúa como una vía de señalización importante en la regulación a corto y largo plazo en las respuestas celulares durante la isquemia cardíaca y la perturbación energética (Fig 2).

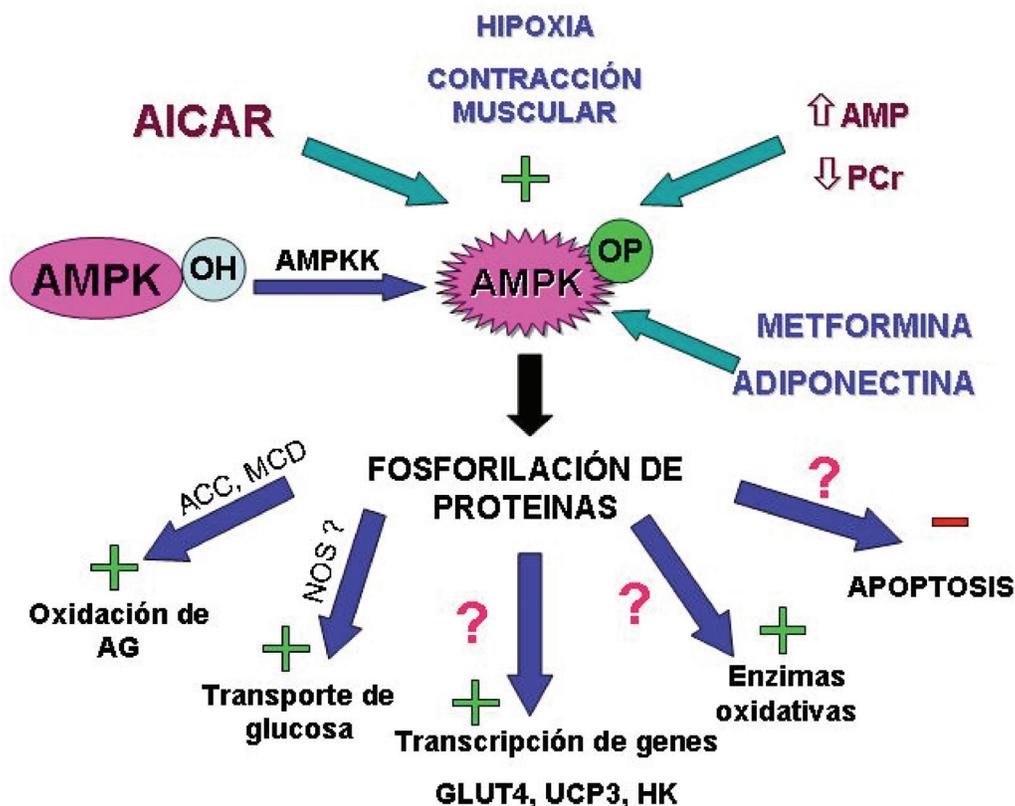


Figura 1. Blancos celulares de la AMPK y su participación en la homeostasis energética. PCr, fosfocreatina, AG, ácidos grasos, GLUT4, transportador de glucosa 4, ACC, acetil-CoA carboxilasa, MCD, malonil-CoA descarboxilasa, UCP3, proteína desacoplante 3, HK, hexocinasa, AICAR (5-Aminoimidazol-4-carboxamida 1-β-D-ribofuranósido, análogo del AMP), NOS, óxido nítrico sintetasa, y AMPKK, AMPK cinasa.

AMPK y función cardiaca

En el corazón, el síndrome metabólico produce desórdenes que producen disturbios en la homeostasis energética del órgano. Estas perturbaciones energéticas están involucradas en la génesis y en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, sin embargo, los mecanismos y las vías de señalización que desencadenan estos procesos se conocen con poco detalle. Bajo condiciones de isquemia e hipoxia, el ATP glucolítico marginal en normoxia, es decir, concentraciones fisiológicas de oxígeno, se convierte en la principal fuente de energía para el mantenimiento de la viabilidad celular. La activación de la AMPK participa en el reclutamiento de los transportadores de glucosa en el sarcolema y en la activación de la glucólisis al fosforilar a la fosfofructocinasa-2, la cual produce fructosa-2,6-bifostato para activar a la fosfofructocinasa I, uno de los pasos limitantes de la vía glucolítica [13,14]. Además, la AMPK está relacionada con la estimulación de la oxidación de los ácidos grasos al fosforilar a la acetil-CoA carboxilasa, con lo cual disminuye el contenido de malonil-CoA, el principal inhibidor fisiológico de la degradación de ácidos grasos [14].

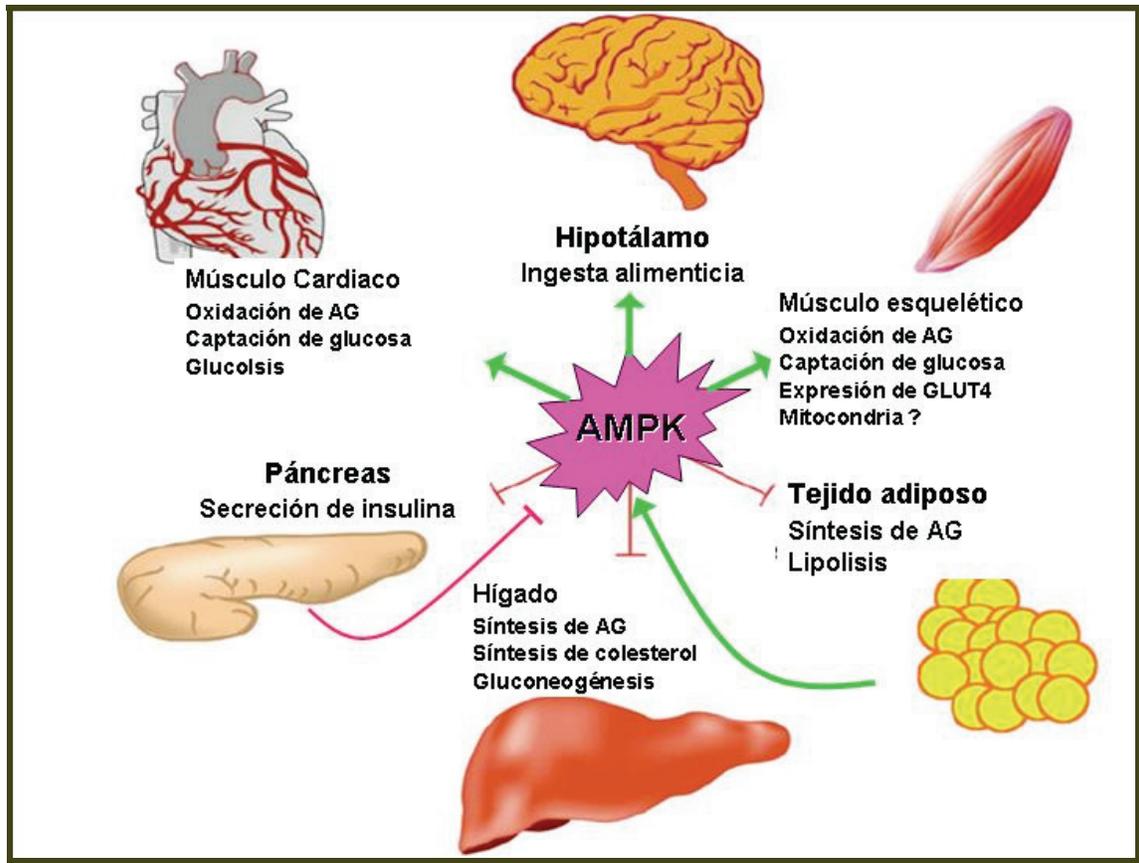


Figura 2. La AMPK como sensor de estrés metabólico y nutricional. AG, ácidos grasos. (Modificado de [5]). Las flechas verdes indican activación y las rosas inhibición de los procesos metabólicos señalados o de la enzima.

Recientemente, se han encontrado varias mutaciones en las subunidades de la AMPK asociadas a cardiomiopatías, tales como la hipertrofia familiar y el síndrome de Wolf-Parkinson-White [15], esto sugiere un papel importante de la enzima en el control del suministro energético. De esta forma, la alteración de la actividad de la AMPK pudiera resultar en el desarrollo de enfermedades cardíacas.

AMPK y síndrome metabólico

Estudios recientes indican que la AMPK tiene un papel importante en la regulación del metabolismo energético de todo el organismo. Las hormonas secretadas por el tejido adiposo, leptina y adiponectina activan a la AMPK en los tejidos periféricos, incluyendo el músculo esquelético e hígado, aumentando el consumo de energía. Por el contrario, en el hipotálamo, la AMPK es inhibida por leptina e insulina, hormonas que normalmente suprimen la ingesta alimenticia, mientras que la grelina, hormona que incrementa esta función, activa a la AMPK. La activación farmacológica de AMPK en el hipotálamo por AICAR (5-Aminoimidazol-4-carboxamida 1- β -D-ribofuranósido, análogo del AMP) promovió el incremento del apetito en ratas, demostrando que la AMPK tiene una participación importante y directa sobre la regulación de la sensación de hambre. Todas estas características sitúan a la AMPK en un lugar privilegiado dentro del control del gasto energético celular y de la ingesta calórica [17]. Dadas las características del síndrome metabólico, pudiera pensarse que este conjunto de desórdenes

endocrino-metabólicos son resultado de perturbar la vía de señalización energética en la que está involucrada esta cinasa, o bien de algún otro componente de la cascada que interfiere con la activación y función de la AMPK. Así mismo, esta enzima se sitúa como un blanco terapéutico importante para incidir en el control de padecimientos en los que se involucre un estado energético desfavorable.

Receptores nucleares activados por proliferadores de los peroxisomas

Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal (PPARs), pertenecen a una amplia familia de receptores nucleares activados por ligandos que actúan como activadores de la transcripción. Los PPARs juegan un papel importante en la regulación transcripcional de genes que codifican para proteínas implicadas en la utilización y almacenamiento de lípidos, en el metabolismo de lipoproteínas, en la diferenciación del adipocito y en la acción de insulina [6]. En la actualidad se conocen tres isoformas de la familia de PPARs, los cuales se expresan en varios tejidos de manera específica. Los PPAR- α se expresan principalmente en el hígado, en músculo esquelético, en el riñón y en menor grado en el corazón. Los PPAR- γ se expresan principalmente en el tejido adiposo, mientras que los PPAR- δ , también conocidos como PPAR- β/δ , se expresan prácticamente en todos los tejidos (Tabla I). El efecto biológico de los PPARs puede estudiarse por el uso de ligandos selectivos; el blanco celular de las tiazolidinedionas (TZD) es el PPAR- γ , mientras que el blanco celular de los fibratos, Wy-14643 y BM 17,0744 es el PPAR- α [18,19]. Los PPARs poseen activadores naturales que incluyen a los ácidos grasos libres (FAs) así como derivados del ácido araquidónico. El papel de PPAR- α en el corazón no es claro, pero se ha encontrado que participa de manera importante en el remodelaje metabólico que ocurre en varias condiciones fisiológicas (ayuno y desarrollo postnatal) y fisiopatológicas (diabetes, hipertrofia y falla cardíaca y cardiomiopatía dilatada) [20,21]. Experimentos *in vitro* con cardiomiocitos neonatales han demostrado que la activación de PPAR- α aumenta la transcripción de genes implicados en el transporte y la oxidación de ácidos grasos [22,23].

A nivel molecular, se ha propuesto que la activación farmacológica de los PPAR γ en células de tejido adiposo mejora su capacidad de almacenar lípidos, lo que disminuye la liberación de ácidos grasos libres y la acumulación de triacilgliceroles en sangre y en músculo, con lo que mejora la respuesta a insulina en estos tejidos. Esta primera explicación, implica la activación de genes que codifican para moléculas que promueven tanto el almacenamiento de lípidos como la lipogénesis, tales como AP2 (proteína de unión de ácidos grasos), CD36 (receptor de lipoproteínas), lipoproteína lipasa (hidrólisis de lipoproteínas), FATP-1 (transportador de ácidos grasos), glicerol cinasa, SREBP-1 y SCD-1 (reguladores de la síntesis de esteroides y ácidos grasos, respectivamente) [24]. Alternativamente, la activación de los receptores PPAR γ con agonistas específicos en adipocitos de animales insulino-resistentes, incrementa la secreción de adiponectina, la cual por sí misma mejora la respuesta a insulina en tejidos periféricos [25]. Del mismo modo, se ha reportado que los portadores de un polimorfismo del gen de PPAR γ que confiere resistencia a desarrollar diabetes tipo II, presentan también niveles elevados de adiponectina, mientras que aquéllos que portan una mutación negativa para el mismo gen presentan niveles bajos de dicha proteína [26]. Sin embargo, las vías de señalización que activa la adiponectina en el tejido muscular y cardíaco para regular el metabolismo energético no son claras. Se presume que podría involucrar la activación de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) y el factor de necrosis tumoral- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) [26].

Tabla I. Isoformas y sitios de expresión de PPARs

	PPARα	PPARβ/δ	PPARγ
SITIO DE EXPRESIÓN	Hígado, músculo, riñón, corazón, macrófagos	Ubicuo	Tejido adiposo, colón, macrófagos
FUNCIONES BIOLÓGICAS	-Oxidación de ácidos grasos (hígado) -Inflamación	-Oxidación de ácidos grasos (músculo) -Diferenciación celular (adipocitos, queratinocitos)	-Adipogénesis -Almacenamiento de lípidos -Inflamación
ACTIVADORES LIGANDOS NATURALES	-Ácidos grasos polinsaturados -Leucotrieno B4 HETES, HODES	-Ácidos grasos saturados e insaturados -Prostaglandina PG12	-Ácidos grasos polinsaturados -15-dexosi- Δ -12PGJ2
ACTIVADORES	Fibratos AINES	Gw501516 L165041	Glitazonas AINES
AINES, anti-inflamatorios no esteroideos; HETES, ácido hidroxi-eicosatetranoico; HODES, ácido hidroxi-octadecadienoico [27].			

Leptina

La leptina es una proteína de 16 kDa sintetizada principalmente por el tejido adiposo. El gen de la leptina se identificó inicialmente como la causa de la mutación en los ratones ob/ob, los cuales presentan hiperfagia, son obesos y desarrollan resistencia a la insulina en la edad adulta. Existen bastantes estudios sobre el papel de la leptina en el control de la ingesta y la homeostasis energética, sin embargo, otro gran número de estudios indican que la leptina también participa en el control del metabolismo lipídico. Este papel regulatorio está mediado por los efectos de la leptina a nivel central y periférico. Se ha reconocido también un efecto parácrino sobre la movilización lipídica en adipocitos, la incubación de estas células con leptina estimula la lipólisis de los triglicéridos intracelulares, efecto que se encuentra ausente en los ratones db/db que carecen del receptor de leptina. La sobre-expresión de esta proteína en células de tejido adiposo reduce la expresión de la acetil CoA carboxilasa (ACC), enzima clave en la síntesis de ácidos grasos. La leptina también puede inhibir la expresión de los elementos de respuesta BP-1c (SREBP-1c) en hígado, en los islotes pancreáticos y en el tejido adiposo, inhibiendo así la lipogénesis en estos tejidos [8]. En otros tejidos, como el músculo liso y cardiaco, la leptina inhibe la lipogénesis y estimula la oxidación de ácidos grasos. Se ha propuesto que el mecanismo por el cual se lleva a cabo este proceso involucra la estimulación directa de la AMPK, la cual al fosforilarse inhibe a la ACC. De esta forma, es evidente que existe una relación estrecha entre la leptina y la AMPK, señalando un vínculo de red de señalización energética común.

Adiponectina

Los niveles de adiponectina en plasma, los cuales son relativamente altos comparados con los de otras adipocitocinas, se encuentran disminuidos en pacientes obesos, con resistencia a la insulina, en diabéticos tipo II o con alguna dislipidemia. En el humano, los niveles de adiponectina se relacionan inversamente con los niveles de triglicéridos sanguíneos y

directamente con la concentración del colesterol HDL, sin embargo, no es claro si existe una relación directa entre los niveles de adiponectina en sangre y los niveles de lípidos circulantes, o si estos hallazgos están relacionados con los efectos directos de la adiponectina sobre la sensibilidad a la insulina.

La expresión de la adiponectina se incrementa por los agonistas de los PPARs, mientras que el TNF- α y la interleucina 6 la inhiben. El mecanismo exacto de la actividad antiaterosclerótica de la adiponectina no está completamente establecido. La asociación entre los niveles de adiponectina y riesgo cardiovascular sugiere que esta proteína es la responsable directa de los efectos sobre la salud vascular, contrario a su efecto indirecto sobre la sensibilidad a la insulina y diabetes. Muchos estudios demuestran un efecto directo de la adiponectina sobre el endotelio y el músculo liso vascular. Se ha postulado también, un posible papel de la adiponectina sobre los procesos inflamatorios, igualmente, estudios clínicos revelan una asociación inversa entre los niveles de adiponectina y marcadores séricos de inflamación. Si su participación en tales eventos es cierta, muy probablemente el efecto esté mediado por su principal blanco de señalización, la AMPK. Existe evidencia de que una forma truncada de adiponectina bacteriana posee efectos anti-inflamatorios asociados a la modulación de NF κ -b y Akt/proteín-cinasa B vía la activación de la AMPK [28]. De esta forma, otro componente importante de las vías de señalización energética que controlan el metabolismo celular está presente en la adiponectina.

El tejido adiposo blanco como órgano que controla el metabolismo energético

El tejido adiposo blanco (TAB) se compone primordialmente por adipocitos, rodeados por tejido conectivo laxo altamente vascularizado e innervado. También contiene macrófagos, fibroblastos, precursores de adipocitos y otros tipos celulares. Los principales depósitos de TAB en los mamíferos se localizan en la región subcutánea y rodeando las vísceras. El TAB constituye un reservorio prácticamente ilimitado de sustrato energético. Durante la ingesta alimenticia, la elevación de insulina estimulada por el aumento de glucosa en sangre promueve la formación y almacenamiento de triglicéridos en hígado y TAB. De manera similar, la disminución de insulina durante el ayuno promueve la utilización de glucógeno y lípidos a través de la activación simpática y elevación de glucagón, epinefrina y glucocorticoides. Éstos últimos mantienen el suministro de glucosa al cerebro y otros órganos vitales. Los ácidos grasos liberados del TAB durante el ayuno son oxidados parcialmente por el músculo y el hígado, generando cuerpos cetónicos que sirven como combustibles alternos para el cerebro y órganos periféricos. De igual manera, los adipocitos participan también en la homeostásis energética mediante la secreción de leptina, adiponectina, la proteína estimuladora de la acilación y otros factores (Tabla II). De manera interesante, el TAB también secreta resistina, angiotensinógeno y algunas otras hormonas y factores parácrinos. Entre ellas es importante destacar aquéllas que participan de manera significativa en el control del metabolismo de lípidos y glucosa, resaltando la complejidad de este tejido para intervenir en el metabolismo energético de él mismo y de órganos periféricos [29].

En este sentido, el TAB, bajo condiciones fisiológicas normales, controla la utilización de sustratos en otros tejidos al liberar hormonas como la leptina y la adiponectina que son transportadas por el torrente sanguíneo hacia otros órganos, en donde a través de las vías de señalización mediadas por sus receptores, activan enzimas claves del metabolismo de lípidos y de glucosa (Fig. 3). Se ha propuesto que el mecanismo mediado por estas redes de señalización involucran justamente la activación de la AMPK y los PPARs en los tejidos periféricos [30]. En ese contexto, las redes de señalización jugarían un papel importante en la regulación a diferentes tiempos: a corto plazo activando la AMPK y, con ello, la modulación de la actividad enzimática a nivel post-transcripcional; y a largo plazo actuando sobre la expresión génica a través de los receptores nucleares PPARs. De igual manera, la liberación de estas adipocinas

tienen un efecto parácrino sobre los propios adipocitos, en los cuales ocurre también la activación de AMPK, estableciéndose así una autorregulación de este órgano.

Tabla II. Moléculas expresadas por el tejido adiposo de acuerdo a su función y a la vía metabólica en la que participan

PROTEÍNAS DE SECRECIÓN	RECEPTORES	ENZIMAS Y TRANSPORTADORES
Leptina	Péptidos y glicoproteínas	Metabolismo de lípidos
Adiponectina	Insulina	Lipoproteína lipasa
Resistina	Glucagón	Apolipoproteína E
Angiotensinogeno	Hormona estimulante de la tiroides	Proteína transportadora de ésteres de colesterol
TNF- α	Hormona del crecimiento	Proteína de unión a ácidos grasos
IL-6	Angiotensina II	CD36
Adipsina	Gastrina/coleescistocinina B	
Proteína estimuladora de la acilación	Adiponectina	Metabolismo de glucosa
Factor adiposo inducido por ayuno	Citocinas	Sustrato del receptor de insulina 1 y 2
PAI-1	IL-6	Fosfatidilinositol 3 cinasa
Factor tisular	TNF- α	Proteína cinasa b (Akt)
Proteína quimo-atrayente de monocitos 1	Leptina	GLUT4
Factor de crecimiento transformante- β	Receptores Nucleares	Proteína cinasa λ/ζ
Visfatina	PPAR γ	
Vaspina	Glucocorticoides	Glucógeno sintetasa 3 α
Proteína de unión a retinol-4	Estrógenos	
	Progesterona	Metabolismo de esteroides
	Andrógenos	Aromatasa
	Tiroideos	11 β -hidroxibutirato deshidrogenasa tipo 1
	Vitamina D	17 β -hidroxibutirato deshidrogenasa
	NF $\kappa\beta$	

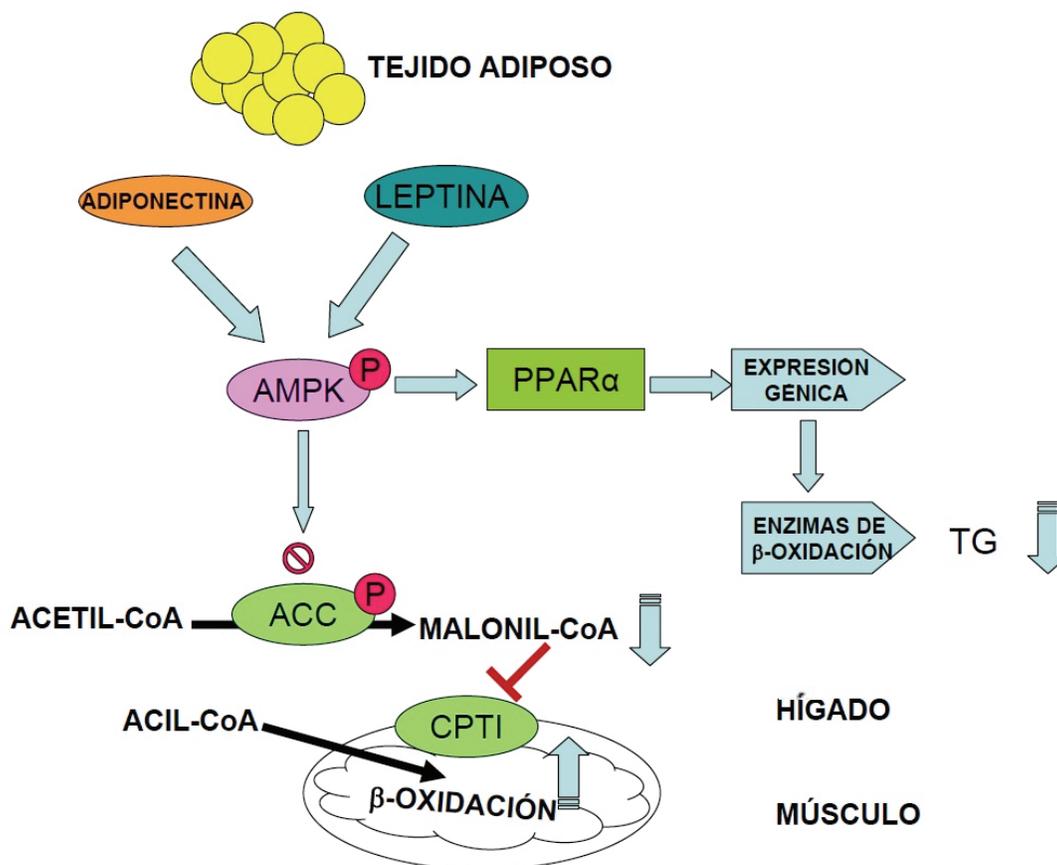


Figura 3. Regulación de la oxidación de ácidos grasos mediada por el tejido adiposo a través de la leptina y la adiponectina.

La leptina y la adiponectina secretadas por el tejido adiposo activan a la AMPK la cual, a su vez, inactiva a la ACC al fosforilarla disminuyendo entonces la producción de malonil-CoA, liberando así la inhibición de la carnitín palmitoil-transferasa I (CPTI), con lo cual se intensifica la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria. A su vez, la activación de AMPK, promueve la activación de los PPARs α quienes promueven la expresión de enzimas que participan en la oxidación de ácidos grasos. ACC, acetil-CoA carboxilasa, CPTI, carnitín-palmitoil-transferasa I, TG, y triglicéridos.

Consideraciones finales

Como se ha descrito, el control del metabolismo energético recae en varios sistemas moleculares y celulares, los cuales interactúan de manera coordinada estableciendo una red de comunicación entre diferentes órganos. Esto explica el impacto que tiene una perturbación en uno de ellos sobre todo el organismo. Los desórdenes endocrino-metabólicos como la obesidad, la diabetes tipo II, la insuficiencia cardíaca, caracterizadas por alteraciones importantes del metabolismo energético, obligadamente están relacionadas con alteraciones en esta vía de señalización energética, en la que participan moléculas claves como los PPARs, la AMPK, la leptina y la adiponectina entre otras. Sin embargo, es evidente que éstas son sólo elementos emergentes de una red mucho más compleja y en la que participan señales importantes mediante las cuales los diferentes órganos y sistemas manifiestan sus necesidades y potenciales energéticos, en respuesta a estímulos externos y carga genética.

Es evidente que el metabolismo del tejido adiposo es importante para el control del contenido de grasa corporal y que en él están involucradas las participaciones de la AMPK y de las PPARs. El punto de regulación entre la síntesis y la oxidación de ácidos grasos en los adipocitos representa un punto estratégico para el tratamiento de desórdenes metabólicos como la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico.

Referencias

1. Reaven, G.M.(1988). Banting lecture 1988. *Diabetes*. 37, 1595-1607.
2. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. *JAMA*. 2002;288:2709-16.
3. Bloomgarden ZT. *Diabetes Care*. 2003;26:3342-8.
4. Carvajal K, Moreno-Sánchez R. *Arch Med Res*. 2003;34:89-99.
5. Carling D. *Trends Biochem Sci*. 2004;29:18-24.
6. Torra IP, Chinetti G, Duval C, Fruchart JC, Staels B. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12:245-54.
7. Ye JM, Doyle PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ, Kraegen EW. *Diabetes*. 2001;50:411-7.
8. Yu YH, Ginsberg HN. *Circ Res*. 2005;96:1042-52.
9. Berg AH, Scherer PE. *Circ Res*. 2005;96:939-49.
10. Lafontan M, Berlan M. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:276-83.
11. Lacquemant C, Vasseur F, Leprêtre F, Froguel P. *Med Sci (Paris)*. 2003;19:809-17.
12. Schimack G, Defronzo RA, Musi N. *Diabetes Obes Metab*. 2006;8:591-602.
13. Hue L, Beauloye C, Marsin AS, Bertrand L, Horman S, Rider MH. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:1091-7.
14. Sambandam N, Lopaschuk GD. *Prog Lipid Res*. 2003;42:238-56.
15. Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, et al. *J Clin Invest*. 2002;109:357-62.
16. Blair E, Redwood C, Ashrafian H, Oliveira M, Broxholme J, Kerr B, et al. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1215-20.
17. Carling D. *Biochimie*. 2005;87:87-91.
18. Meyer K, Völkl A, Endeke R, Kühnle HF, Pill J. *Arch Toxicol*. 1999;73:440-50.
19. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, et al. *J Biol Chem*. 2001;276:41245-54.
20. Barger PM, Kelly DP. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10:238-45.
21. Van Der Lee KA, Willemsen PH, Van Der Vusse GJ, Van Bilsen M. *FASEB J*. 2000;14:495-502.
22. Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP. *J Biol Chem*. 1998;273:23786-92.
23. van der Lee KA, Vork MM, De Vries JE, Willemsen PH, Glatz JF, Reneman RS, et al. *J Lipid Res*. 2000;41:41-7.
24. Blaak EE, Wagenmakers AJ. *Diabetes*. 2002;51:784-9.
25. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, et al. *Diabetologia*. 1999;42:113-6.
26. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:15924-9.
27. Carvajal K, Hernández-Esquivel L, Moreno-Sánchez R. *Arch Cardiol Mex*. 2007;77(S4):S4-66-S4-76.
28. Hug C, Lodish HF. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5:129-34.
29. Ahima RS. *Obesity*. 2006;14:242S, 249S.
30. Rossmeisl M, Flachs P, Brauner P, Sponarova J, Matejkova O, Prazak T, Ruzickova J, Bardova K, Kuda O, Kopecky J. *International Journal of Obesity*. 2004; 28: S38-S44.

Semblanza de la Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera



Originaria de la ciudad de Salamanca Gto., la Dra. Karla Carvajal Aguilera inició sus estudios en la Universidad Autónoma Metropolitana, donde obtuvo la licenciatura en Biología Experimental, posteriormente cursó la Maestría en Biología Experimental y el Doctorado en Ciencias Biológicas en esta misma institución. La Dra. Carvajal se desempeñó inicialmente como investigadora en el Instituto Nacional de Cardiología, donde realizó el trabajo experimental de sus tesis de maestría y doctorado sobre metabolismo y función cardiovascular, realizadas en el departamento de Bioquímica de este instituto. Este estudio la llevó a publicar varios trabajos internacionales en revistas de alto prestigio, así como publicaciones nacionales. La Dra. Carvajal ha contribuido también en la formación de recursos humanos, participando en la asesoría de tesis de licenciatura y en la impartición de cursos de bioquímica a nivel licenciatura y postgrado en la facultad de química de la UNAM. Recientemente Karla Carvajal realizó una estancia postdoctoral en el laboratorio de Cardiología Celular y Molecular en Châtanay Malabry, Francia. El trabajo realizado durante este tiempo dio como resultado la publicación de dos artículos de investigación de alto impacto y su presentación en varios congresos internacionales. A la fecha, la producción científica de la Dra. Carvajal ha sido citada en más de 100 ocasiones en revistas internacionales y nacionales. Actualmente la Dra. Carvajal es Investigador Nacional nivel I y en el año 2007 se integró al Instituto Nacional de Pediatría como Investigador en Ciencias Médicas D, donde ha comenzado una línea de investigación sobre síndrome metabólico y obesidad, uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país. El interés de su estudio es establecer la interacción de ciertos factores y señales celulares como la AMPK, los PPARs, la leptina y la adiponectina, como una red de señalización energética celular, así como su participación en los desórdenes endocrino-metabólicos, como la obesidad y diabetes tipo II, así como las complicaciones cardiacas asociadas, tales como la hipertrofia cardiaca, enfermedad isquémica y falla cardiaca.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

METABOLISMO ENERGÉTICO DEL SODIO: ENZIMAS QUE USAN LOS IONES DE SODIO EN LUGAR DE PROTONES

Oscar Juárez y Blanca Barquera

Department of Biology and Center for Interdisciplinary Studies.

Rensselaer Polytechnic Institute.

Troy, NY. USA

barqub@rpi.edu

Resumen

En la mayoría de las células los protones son usados como la moneda energética. Sin embargo, en algunas bacterias los iones de sodio pueden llevar a cabo esta función. Las bacterias pueden generar un gradiente de sodio en tres formas diferentes: (i) en bacterias que no tienen una bomba primaria de sodio, el gradiente de sodio puede ser generado gracias a la transformación del gradiente de protones a un gradiente de sodio por los antiportadores Na^+/H^+ , (ii) por las reacciones catalizadas por bombas primarias acopladas a reacciones químicas como la descarboxilación y (iii) por las reacciones catalizadas por bombas primarias acopladas directamente a la respiración; estas enzimas acoplan el transporte de electrones al bombeo de sodio a través de la membrana plasmática.

En este artículo revisaremos las propiedades de las bombas primarias dependientes de sodio en bacterias. En particular nos enfocaremos en la única enzima respiratoria que bombea sodio: la NADH:quinona oxidoreductasa dependiente de Na^+ (Na^+ -NQR). Esta enzima convierte la energía de oxidorreducción de la oxidación del NADH y la reducción de la quinona, en un gradiente electroquímico de sodio. Nuestro objetivo en estudiar esta enzima es entender los mecanismos moleculares que hacen posible dicha transformación de energía.

Palabras clave: Metabolismo energético, sodio, respiración, bacterias.

Abstract

Protons are the energy-coupling cations in most ion-driven transport systems. However, in some bacteria sodium ions can be used as the energy-coupling ion. Bacteria can generate sodium motive force ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$) by three different mechanisms: (i) in bacteria that lack a primary Na^+ pump capable to generate $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ directly, the proton gradient generated by respiration is converted to a Na^+ gradient by the Na^+/H^+ antiporter, (ii) primary sodium pumps coupled chemical reactions such as the Na^+ translocating decarboxylases, and (iii) primary respiratory pumps that directly pump Na^+ via the respiratory chain.

*Here, we review the properties of the bacterial primary pumps, in particular the enzymes that are able to translocate Na^+ across the cell membrane. We will focus to the only known respiratory Na^+ pump: the Na^+ -pumping NADH:quinone oxidoreductase (Na^+ -NQR). This enzyme is the gateway for electrons into the aerobic respiratory chain of *Vibrio cholerae* and many other marine and pathogenic bacteria. Na^+ -NQR converts the energy from the oxidation of NADH and the reduction of quinone into an electrochemical Na^+ -gradient that can provide energy for the cell. Our long-term goal in studying this enzyme is to understand the molecular mechanism that makes this energy transformation possible.*

Keywords: Sodium, energy metabolism, bacterial respiration.

Introducción

El funcionamiento del sistema de la fosforilación oxidativa, que es utilizado en la producción de energía, está explicado por la teoría quimiosmótica, propuesta inicialmente por P. Mitchell [1]. El gradiente protón-motriz ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$), generado en la respiración, es usado por las células como la fuerza motora que impulsa el transporte de nutrientes, la síntesis de ATP y el funcionamiento del flagelo, entre otros [2,3]. En muchos organismos los protones son usados como la conexión iónica entre las bombas productoras y los sistemas consumidores del gradiente (Figura 1). Sin embargo, los protones no son los únicos iones usados en funciones energéticas y hay un número importante de organismos que pueden utilizar a los iones de sodio. Unemoto, Dimroth y Muller [4,5] describieron que algunas bacterias marinas son capaces de bombear Na^+ en un proceso directamente acoplado a la respiración aerobia, a la reacción de descarboxilación y a la hidrólisis de ATP. También se ha descrito que los gradientes de sodio y de protones están interconectados por antiportadores Na^+/H^+ , los cuales son capaces de producir un gradiente de sodio, a expensas del gradiente de protones (o viceversa) [6]. En su conjunto estos sistemas demuestran que los iones de sodio también pueden ser utilizados como “moneda” energética por las bacterias. En esta revisión se abordan algunas características de los diversos transportadores de sodio, incluyendo a la única enzima respiratoria reportada hasta ahora que es capaz de formar un gradiente de sodio, la NADH:quinona oxidorreductasa dependiente de sodio (Na^+ -NQR) [7-9].

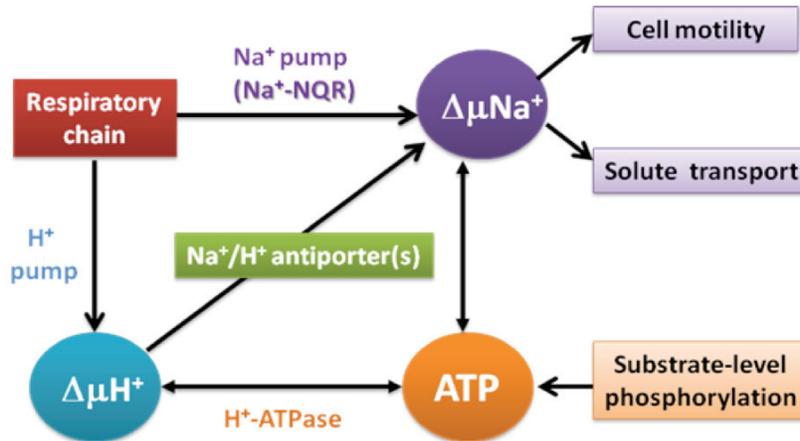


Figura 1. Representación de las conexiones energéticas en las bacterias capaces de usar la fuerza sodio-motriz. En *Vibrio cholerae*, la cadena respiratoria es capaz de formar dos tipos de gradientes: de protones y de sodio. Estos gradientes están conectados por los antiportadores de Na^+/H^+ . La fuerza protón motriz es utilizada para la síntesis de ATP y la fuerza sodio-motriz es utilizada para el transporte de nutrientes, (por ejemplo aminoácidos y azúcares) y para la motilidad celular.

Transportadores activos primarios

Los transportadores primarios usan energía para mover un soluto (por ejemplo, iones) en contra de su gradiente de concentración. Las posibles fuentes de energía utilizadas por estos transportadores son: A) la energía electromagnética (luz), B) la energía química y C) la energía de oxidorreducción (Figura 2).

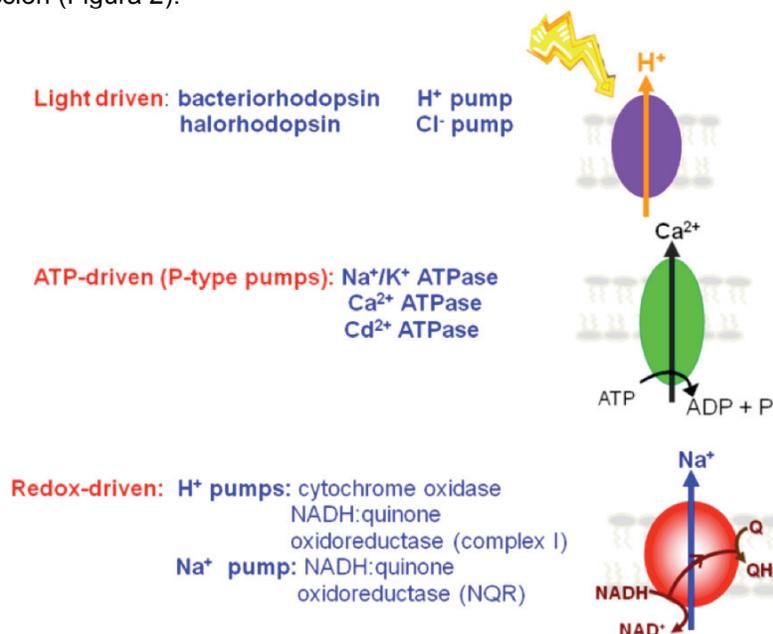


Figura 2. Ejemplos de transportadores activos primarios.

A. Transportadores dependientes de la luz

Estos transportadores utilizan la energía luminosa para transportar solutos. Algunos ejemplos de este tipo de transportadores son las rodopsinas microbianas translocadoras de protones y los centros de reacción fotosintéticos [10-12].

B. Transportadores dependientes de energía química

B.1. La hidrólisis de los enlaces de alta energía del ATP o fosfato inorgánico es utilizada por este tipo de transportadores. La dirección del transporte varía dependiendo del transportador. Algunas de estas proteínas pueden ser fosforiladas durante la reacción de transporte y en general el sustrato no es fosforilado.

Este grupo de transportadores es muy diverso e incluye un gran número de proteínas:

B.1.1. Familia del tipo ABC (ATP-binding cassette proteins) [13,14].

B.1.2. Los transportadores de arsenito/antimonio [15,16].

B.1.3. El sistema secretorio general [16, 17].

B.1.4. Las ATPasas dependientes de H^+ o Na^+ de tipo F, V o A [18-22].

B.1.5. Las ATPasas del tipo P [23,24].

B.2. Transportadores dependiente de reacciones de descarboxilación.

Estas proteínas han sido descritas exclusivamente en procariontes y catalizan el transporte de iones (Na^+) usando la energía proveniente de las reacciones de descarboxilación.

B.2.1. Oxaloacetato descarboxilasa.

B.2.2. Metil-malonil-CoA- descarboxilasa.

B.2.3. Glutaconil-CoA- descarboxilasa.

B.2.4. Malonato descarboxilasa [25-28].

B.3. Transportadores dependientes de la reacción de la metil-transferasa

La Na^+ -metil-tetrahidrometanopterin:coenzima M-metil transferasa está presente solamente en arqueas y es la única enzima caracterizada en este grupo [29].

C. Transportadores dependientes de reacciones de oxido-reducción

Estas proteínas transportan iones gracias a la reacción exergónica de oxidorreducción entre un sustrato reducido y uno oxidado. Este grupo incluye a las proteínas de la cadena respiratoria de bacterias y de la mitocondria.

C.1. NADH deshidrogenasas translocadoras de H^+ [30].

C.2. Transhidrogenasas translocadoras de H^+ [31].

C.3. Complejo bc1 [32].

C.4. Citocromo oxidasa [33,34].

C.5. Oxidorreductasas de hidrógeno:heterodisulfuro [34].

C.6. $F_{420}H_2$ deshidrogenasa translocadora de protones [35].

C.7. NADH: quinona oxidorreductasa translocadora de Na^+ [8,9].

C.8. NADH: ferredoxina oxidorreductasa translocadora de H^+ o Na^+ [36,37].

C.9. Formil-metanofurano deshidrogenasa translocadora de Na^+ o H^+ [38].

Bombas primarias de sodio

Las bombas de sodio se encuentran distribuidas principalmente en bacterias (Tabla I)

Tabla I. Distribución de los transportadores primarios de sodio.

Clase de bomba	Ejemplos Bacteria
ATPasas del tipo F, V o A.	
ATPasa tipo F	<i>Propionigenium modestum</i>
ATPasa tipo V	<i>Enterococcus hirae</i> (NtpLMNOPQ)
Transportadores dependientes de reacciones de descarboxilación.	
Oxaloacetato descarboxilasa	<i>Salmonella typhimurium</i>
Metilmalonil-CoA- descarboxilasa	<i>Veillonella parvula</i>
Glutaconil-CoA- descarboxilasa	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
Malonato descarboxilasa	<i>Malonomonas rubra</i>
Metilmalonil-CoA descarboxilasa	<i>Pyrococcus abyssi</i>
Metiltetrahidrometanopterin-CoM-Metil-transferasa	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
NADH:quinona oxidorreductasa translocadora de Na ⁺ .	<i>Vibrio cholera</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Yersinia pestis</i> , etc
NADH:ferredoxina oxidorreductasa translocadora de H ⁺ o Na ⁺ .	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
NADH deshidrogenasa tipo RNF	<i>Escherichia coli</i> , <i>Acetobacterium woodii</i> .
Formil-metanofuranodeshidrogenasa translocadora de Na ⁺	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> <i>Methanobacterium barkeri</i>

Propiedades de las bombas de sodio

B.2. Transportadores dependientes de reacciones de descarboxilación

Los transportadores de la familia NaT-DC catalizan la descarboxilación de ácidos dicarboxílicos y usan la energía que se produce en esta reacción para transportar uno o dos iones Na⁺ hacia afuera de la célula. Estas proteínas han sido descritas en bacterias y arqueobacterias. Las descarboxilasas que se han caracterizado, dependiendo del ácido dicarboxílico que utilizan, se clasifican en las de: 1) oxaloacetato, 2) metilmalonil CoA, e) glutaconil- CoA y 4) malonato. Estas enzimas forman un complejo de 3 subunidades y usan biotina como cofactor [39].

Se han obtenido cristales de alta resolución de la subunidad a de la glutaconil CoA descarboxilasa (Gcda) de la bacteria *Acidaminococcus fermentans*. El modelo cristalográfico sugiere que el sitio activo del dímero de la enzima reside en la interfase entre los dos monómeros. El glutaconil-CoA se une al amino terminal, mientras que la biotina se une al carboxilo terminal. La enzima transfiere CO₂ del glutaconil-COA a la proteína transportadora de biotina (en la subunidad G), que es finalmente descarboxilada en la subunidad B, donde el sodio

es transportado al exterior de la célula. Esta subunidad tiene 9 hélices transmembranales y se han identificado varios aminoácidos involucrados en el proceso de bombeo de sodio, como D203, Y229 y N373, G377 y R389. En particular, D203 y S382 funcionan como sitios de unión del sodio intramembranal [40].

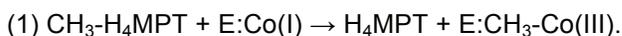
La reacción general que estas enzimas catalizan es:



B.3. Transportadores dependientes de la reacción de la metil-transferasa

Estas enzimas forman un complejo multienzimático de 8 subunidades, denominadas MtrA-H. Se ha sugerido que la subunidad E está involucrada en el transporte de sodio, mientras que la subunidad A contiene una cobalamida como grupo prostético, la cual se metila y desmetila en el ciclo catalítico de la enzima, siendo la reacción de desmetilación dependiente de sodio. La transferencia de un metilo de la subunidad A a la coenzima M produce la energía para la translocación del sodio ($\Delta G^{\circ} = -30 \text{ kJ/mol}$).

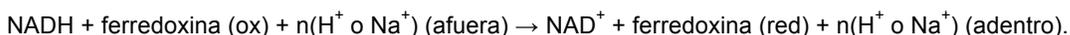
Estas enzimas catalizan la siguiente reacción:



La reacción (1) es reversible, en contraste con la reacción (2) que es irreversible en el sentido mostrado y está posiblemente acoplada al bombeo de sodio [29,41].

C.8. NADH: ferredoxina oxidoreductasa translocadora de H^+ o Na^+ (RNF)

Las enzimas del grupo de RNF (Rhodobacter Nitrogen Fixing protein) son complejos multienzimáticos formados por 6 o 7 subunidades que catalizan la transferencia de electrones entre el NADH y la ferredoxina, cuya reacción esta posiblemente acoplada a la translocación de Na^+ o protones de la siguiente forma:



El complejo mejor caracterizado, es el de *Rhodobacter capsulatus*, el cual es esencial para la fijación de nitrógeno y se ha postulado que cataliza el transporte de electrones entre el NADH y la ferredoxina, la cual a su vez dona electrones a la nitrogenasa. Sin embargo, su función sigue siendo desconocida y se ha identificado RNF en organismos que no fijan nitrógeno, como *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.

La RNF es homóloga de la NADH:quinona oxidoreductasa translocadora de sodio (Na^+ -NQR), en particular con las subunidades que se han propuesto que están involucradas en la translocación del Na^+ . En la Figura 3 se muestra un esquema del complejo RNF, en donde las subunidades homólogas entre ambas enzimas son mostradas.

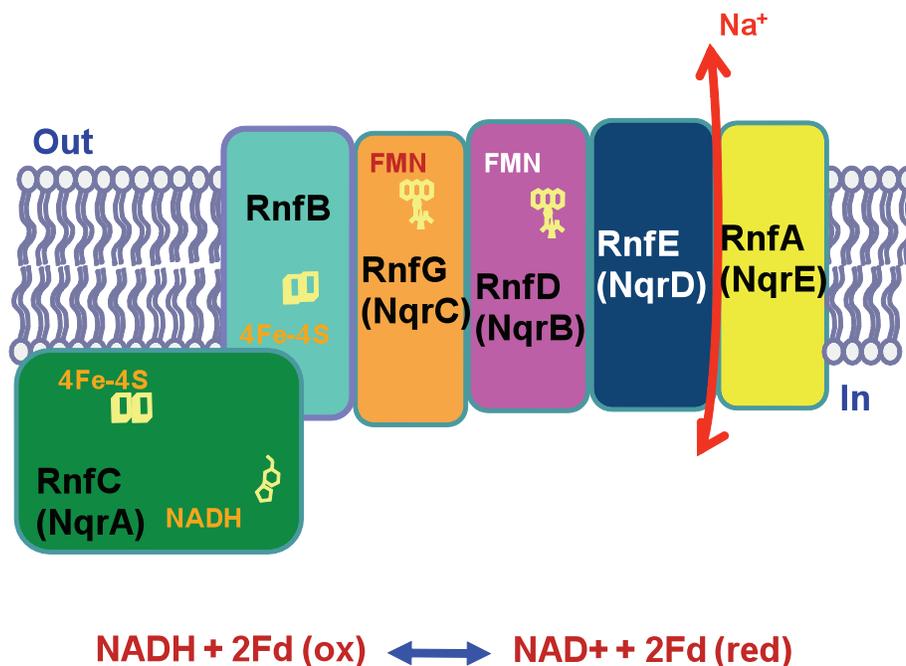
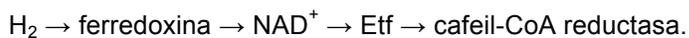


Figura 3. Esquema del arreglo de subunidades y cofactores en RNF. En paréntesis se muestran las subunidades homólogas de Na⁺-NQR.

Las subunidades A, D y E de la RNF son proteínas hidrofóbicas con varias hélices transmembranales. Las subunidades B y C contienen secuencias conservadas para la unión de centros hierro azufre, del tipo [4Fe-4S], parecidos a las ferredoxinas de plantas. RnfC presenta un sitio de unión al NADH parecido al del complejo I.

Recientemente describimos que RNF es una flavoproteína, con dos FMN unidos covalentemente a las subunidades D y G. El sitio de unión del FMN es semejante al encontrado en NqrB y NqrC, donde una treonina forma un enlace fosfoéster con el fosfato del FMN (Figura 7). Cabe mencionar que el motivo encontrado en RnfD, es una variante del motivo original S(T)GAT (MAGAT).

El grupo de Muller ha caracterizado al complejo RNF en la bacteria anaeróbica acetogénica *Acebacterium woodii*. En esta bacteria la reducción del cafeato está acoplada a la síntesis de ATP, debido a que los iones sodio son translocados por RNF y usados por la ATP sintetasa, en un proceso conocido como respiración dependiente de cafeato:



C.9. Formil-metanofurano deshidrogenasa translocadora de Na⁺ o H⁺

La formil-metanofurano deshidrogenasa de *Methanosarciana barkeri* acopla el transporte de sodio a la reducción reversible del CO₂, dependiente de metanofurano [29].

Tipos de NADH deshidrogenasas

Se han descrito tres familias de enzimas que son capaces de realizar la transferencia de electrones de la molécula de NADH a la ubiquinona. El grupo I corresponde a un complejo enzimático cuya composición varía de 13 a más de 40 subunidades (dependiendo de la fuente), y se encuentra distribuido primordialmente entre bacterias y eucariontes (Figura 4a). Los miembros de esta familia utilizan la energía liberada por la reacción redox para bombear protones ($2\text{H}^+/\text{e}^-$) y tienen como cofactores una molécula de FMN unida no covalentemente y hasta 10 centros Fe-S. El segundo grupo, también conocido como NDH-2, corresponde a las NADH deshidrogenasas alternas, las cuales están compuestas por una sola subunidad de 30-60 kDa y presentan como cofactor a una molécula de FAD, unida por interacciones no covalentes. Una característica interesante de esta familia es que son el único tipo de NADH deshidrogenasas membranales que no bombean iones (Figura 4b). A pesar de no estar vinculadas directamente con la síntesis de ATP, la familia de NDH-2 es la más ampliamente distribuida y se encuentra en arqueobacterias, bacterias y en la mitocondria de los eucariontes [30,42,43].

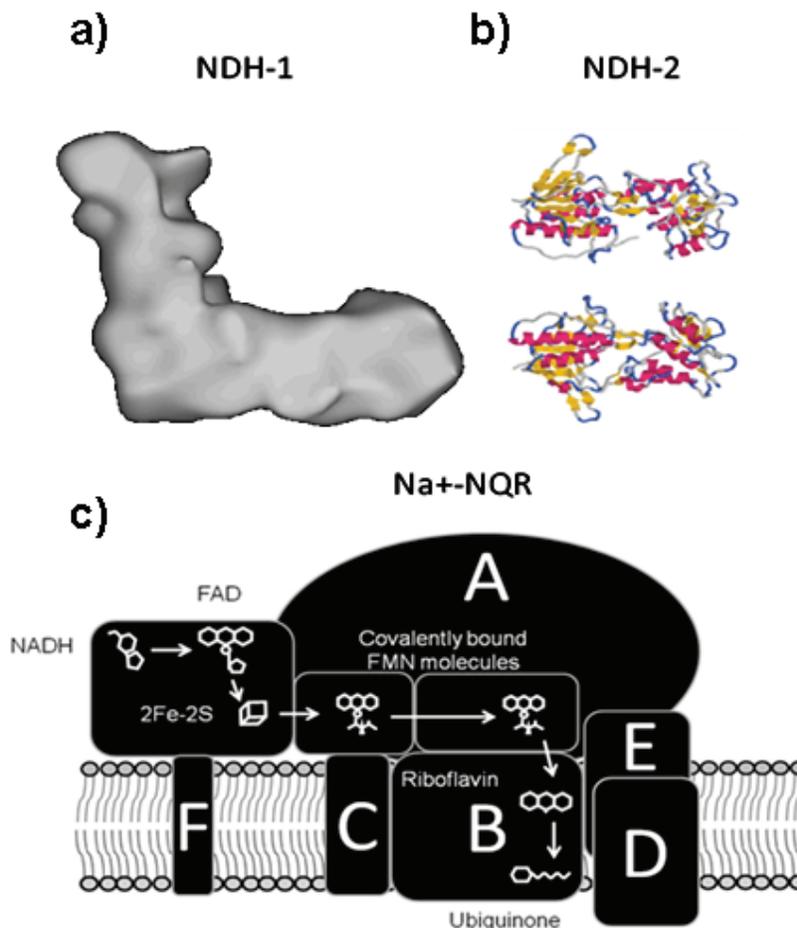


Figura 4. Representación esquemática de los tres tipos de NADH deshidrogenasas. a) Reconstrucción de la estructura del complejo I de *E. coli* obtenida por microscopía electrónica [44]. b) Dos vistas de la predicción de la estructura terciaria de NDH-2 de *E. coli*. c) Esquema del arreglo de las subunidades y cofactores de la Na^+ -NQR y con las flechas se denota la ruta que siguen los electrones en la enzima.

El tercer tipo de enzimas es conocido como Na⁺-NQR (**Na⁺- dependent NADH: Quinone Reductase**). Este tipo de enzimas son capaces de bombear iones de sodio a través de la membrana plasmática, produciendo un gradiente electroquímico análogo al de protones, que es utilizado para realizar diversas funciones como el transporte de nutrientes, toxinas o fármacos, para la motilidad celular, la síntesis de ATP, entre otros. La Na⁺-NQR presenta seis subunidades y tiene un peso molecular de alrededor de 200 kDa (Figura 4c). Su distribución es relativamente más restringida que los otros tipos de NADH deshidrogenasas, encontrándose en linajes procariontes emparentados, como las proteobacterias α, β y γ pero también se encuentra en otros tipos de bacterias no relacionadas entre sí como los bacteriodetes, clorobios y clamidias lo que sugiere que eventos de transferencia horizontal de genes pudieron participar en la distribución actual de la enzima. Por otro lado, la Na⁺-NQR está ausente tanto en arqueobacterias y eucariontes, aunque aparentemente en algunas arqueobacterias como *Methanosarcina acetivorans*, la enzima RNF (la cual está relacionada con Na⁺-NQR) puede catalizar una reacción análoga a la de Na⁺-NQR [2,3,27,45].

Composición de la Na⁺-NQR

En los intentos originales para purificar a la Na⁺-NQR de *Vibrio harveyi* se describió que la enzima estaba compuesta de tres subunidades, α, β y γ con pesos moleculares aparentes de 50, 46 y 32 kDa, respectivamente [7]. Al analizar la secuencia de los tres péptidos se determinó que se encontraban codificados en un operón y que están acompañados de otras tres subunidades [46-48], que debido a su alta hidrofobicidad eran difíciles de detectar por electroforesis en gel desnaturante. En la figura 5 se muestra un gel desnaturante en poliacrilamida teñido con azul de Coomassie donde se aprecian las subunidades de la Na⁺-NQR y también se puede ver que las subunidades B y D son fluorescentes cuando se exponen a la luz UV.

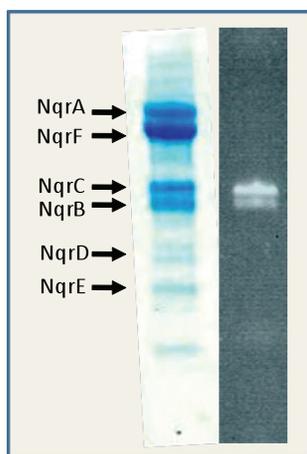


Figura 5. Composición de la Na⁺-NQR. A la izquierda se muestra la electroforesis en gel desnaturante de una purificación de la Na⁺-NQR teñida con azul de Coomassie. En el carril de la derecha se muestra la fluorescencia de las subunidades B y C bajo luz UV.

Subunidades, topología y motivos estructurales

Las subunidades de Na⁺-NQR fueron denominadas NqrA-F de acuerdo a su ubicación en el operón con respecto a la secuencia de origen de la transcripción [7]. La subunidad A es una proteína hidrofílica que tiene un peso molecular de 50 kDa (Tabla II) y de acuerdo con algunos algoritmos de predicción de estructura secundaria presenta un plegamiento tipo α/β . Al

igual que otras de las subunidades de Na⁺-NQR tiene como su homólogo más cercano a la subunidad C de la proteína RNF[49,50]. Esta subunidad no presenta cofactores conocidos y tampoco se ha identificado si tiene algún papel en el transporte de sodio, pero podría tener un papel importante en el ensamblaje o en la estabilidad de Na⁺-NQR, ya que no es posible aislar al complejo enzimático en células donde el gen de esta subunidad ha sido eliminado por métodos de biología molecular (datos no publicados).

La subunidad B es una proteína hidrofóbica con nueve cruces transmembranales y un asa intracelular entre las hélices 5 y 6, de aproximadamente 50 residuos (Figura 6), donde se encuentra el motivo de unión a FMN. La Na⁺-NQR es una de las pocas proteínas que son capaces de unir a los cofactores de flavina de manera covalente y pertenece a una familia relativamente nueva, en donde se encuentran la proteína reguladora de la expresión de la NO₂ reductasa (NOsR), la proteína reguladora Nir1 y otras proteínas membranales poco caracterizadas [51,52]. Los miembros de esta familia realizan la unión del cofactor por un enlace de tipo fosfoéster entre la molécula de FMN y un residuo de la cadena polipeptídica con un grupo alcohol, en particular el residuo de treonina que se encuentra en el carboxilo terminal del motivo conservado: (D/Q)-X₁₋₆-D-X₂-(S/T)(G/M)AT (Figura 7) [53-55]. Otra característica interesante de esta subunidad es que presenta zonas hidrofílicas en las hélices transmembranales, en particular destacan residuos ácidos de aspartato y glutamato en las hélices 1, 3, 5, 6 y 8, y dos más en la hélice 9, los cuales están perfectamente conservados en la familia de Na⁺-NQR y cuatro de ellos también se encuentran conservados en la subunidad homóloga RNF (RnfD) [49]. Los estudios realizados en nuestro laboratorio indican que la mayoría de esos residuos juegan un papel ya sea en la unión o en el transporte de sodio (ver más adelante). También se han encontrado cerca de diez residuos polares sin carga en diversas regiones transmembranales de esta subunidad. Sin embargo, solo dos están conservados, por lo que en general su papel puede ser pequeño [56].

La subunidad C presenta 2 cruces transmembranales (Figura 6) y un dominio intracelular de 200 residuos, donde se encuentra el sitio de unión covalente de la segunda molécula de FMN de la proteína. Este sitio presenta un arreglo similar al encontrado en el sitio de unión del FMN en la subunidad B (Figura 7) [56].

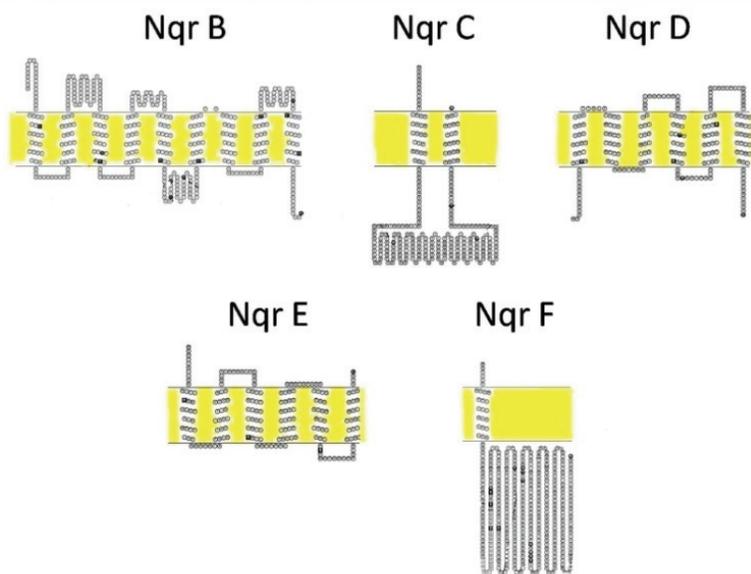


Figura 6. Arreglo topológico de las cinco subunidades transmembranales de la Na⁺-NQR.

```

      .  :      . *  . :  **  .
NqrC  GAPQGSEHGV DGLSGATLTSNGVQNTFDF
RnfG  GG-Q-----FDQFTGATITPRAVVLAVKK

NqrB  ISGDLVWTAADGYSGATALSQWAQGGAGA
RnfD  LSLQQIRTGIDGITMATPLDAFKTS-----
    
```

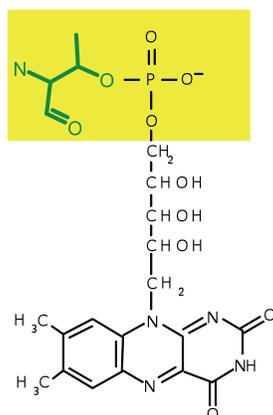


Figura 7. Motivos de unión de las moléculas de FMN. En la parte superior se muestran las secuencias de unión de la molécula de FMN en las subunidades C y B de Na⁺-NQR, así como en las subunidades G y D de RNF. En la parte inferior se esquematiza el enlace de tipo fosfoéster entre la molécula de FMN y un residuo de treonina

Las subunidades D y E son proteínas altamente hidrofóbicas con 6 cruces transmembranales (Figura 6), las cuales presentan 6 y 5 residuos negativos, respectivamente, que al igual que en el caso de la subunidad B están conservados en la familia de Na⁺-NQR. Estas dos subunidades forman un grupo estrechamente relacionado y los análisis filogenéticos muestran que aparentemente se originaron a partir de la duplicación de un gen ancestral, para luego divergir al linaje de Na⁺-NQR y RNF. La subunidad B también presenta similitud con este grupo, aunque es sustancialmente menor. Sin embargo, es plausible que el núcleo central de Na⁺-NQR (y de RNF), compuesto por las tres subunidades más hidrofóbicas (B, D y E en Na⁺-NQR), haya evolucionado de manera conjunta y en eventos posteriores se pudieron incorporar los demás componentes.

La subunidad F presenta un segmento transmembranal y un dominio hidrofílico de 380 residuos. El dominio soluble es homólogo a los miembros de la familia FNR (Ferredoxin Reductasa) y presenta un motivo conservado de cuatro cisteínas de tipo: C-X₅-C-X₂-C-X₃₀-L(A/T)CQ, que es responsable de la unión del centro 2Fe-2S. Al igual que otros de los miembros de esta familia, la NqrF presenta motivos de unión de FAD y de NADH (Figuras 8 y 9).

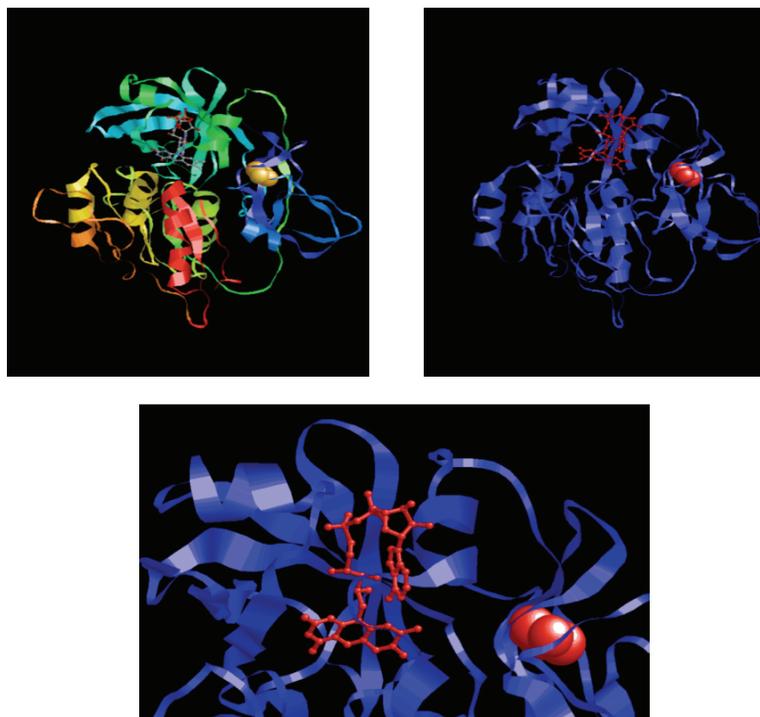


Figura 9. Modelo de la estructura del dominio soluble de NqrF. El modelo se realizó por métodos de modelaje por homología utilizando las estructuras de la Benzoato 1,2-dioxigenasa y de la toluato 1,2-dioxigenasa como plantados, utilizando el programa Modeller. Los autores agradecen el apoyo de D. I. Paredes en el modelaje de esta subunidad.

Cofactores y señales de radicales

Los estudios originales demostraban que la Na^+ -NQR presentaba una molécula de FAD unida por interacciones no covalentes, que se encontraba en una posición desconocida. Posteriormente, Rich [57] demostró la presencia del sitio de unión al FAD en la subunidad NqrF y de un motivo conservado de unión de un centro que inicialmente se sugirió que podría ser de tipo 4Fe-4S. Más tarde, se describió que el centro Fe-S encontrado en la enzima correspondía a uno de tipo 2Fe-2S. Reportes posteriores sugirieron que la proteína también contenía flavina unida covalentemente a la fracción proteica. En estos estudios se demostró que la identidad de esa flavina era una molécula de FMN unida mediante un enlace de tipo fosfoéster al residuo de serina 225 en la subunidad C. Unemoto y cols. [53] se percataron que el motivo de unión a FMN estaba conservado en diferentes miembros y que un motivo similar estaba presente en la subunidad B (Figura 7). Barquera y cols. demostraron que ese sitio era el responsable de la unión del FMN en la subunidad B [55]. Estos resultados se pueden comprobar fácilmente mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida. Al exponer al gel a la luz UV las bandas con FMN unido de manera covalente muestran una fluorescencia característica (Figura 5).

Las flavinas funcionan como centros redox capaces de realizar reacciones con uno o dos electrones a la vez. En el caso de las reacciones que involucran un electrón, se forman especies radicales y puesto que en la reacción redox está acompañada por protones, los radicales pueden ser de dos clases, neutros o aniónicos, los cuales pueden ser detectados por sus señales características en el espectro visible o por sus espectros en EPR/ENDOR. En muchas

flavoproteínas estas especies pueden ser atrapadas en el curso de la reacción de reducción. Por otro lado, las señales de EPR de estos radicales se pueden distinguir por el ancho de banda. El radical neutro presenta un ancho de banda de 20 G, mientras que el radical aniónico tiene un ancho de banda de entre 15 y 17 G. Las diferencias entre los dos radicales también pueden ser estudiadas por ENDOR, que combina la resonancia de electrones y núcleos [9,58] (Ver Figura 10).

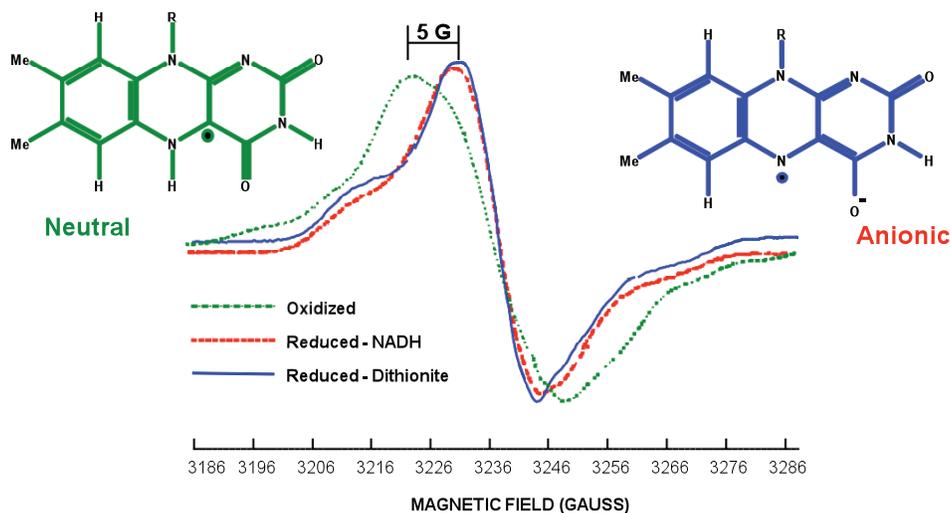


Figura 10. Espectros de EPR de las formas neutra y aniónica de las flavinas en Na^+ -NQR.

La Na^+ -NQR tiene características inusuales en cuanto a las propiedades de los radicales de flavinas. La enzima presenta tres radicales de flavina que han podido ser distinguidos principalmente por espectroscopia de EPR: 1) un radical neutro, que se observa en la forma oxidada de la enzima silvestre y de las mutantes NqrB-T236Y y NqrC-T225Y, lo que indica que proviene de la riboflavina (ver más adelante), 2) un radical aniónico, que se puede observar en la enzima completamente reducida; este radical se observa en la cepa silvestre y en la mutante NqrC-T225Y pero no en la mutante NqrB-T236Y, lo que indica que el radical proviene del FMN en NqrB y 3) un segundo radical neutro, que se observa principalmente en condiciones de reducción parcial de la enzima; este radical se observa en la cepa silvestre y en la mutante NqrB-T236Y pero no en la mutante de NqrC, lo que indica que el FMN de NqrC es el responsable de este último radical. El hecho de que los radicales aniónicos en FMNB y FMNC se observen a diferentes grados de reducción indica que sus potenciales redox son diferentes. El radical aniónico de FMNB se observa a niveles estequiométricos en condiciones de reducción completa, mientras que el radical proveniente del FMNC solo presenta una estequiometría del 50% y es mucho más fácil de reducir que el radical en FMNB. Las diferencias de potencial redox han sido consideradas en el estudio de cinética rápida de la enzima [58,59]. La Figura 11 muestra los espectros de EPR de la cepa silvestre y de las mutantes NqrB-T236Y y NqrC-T225Y. En cada espectro se presenta el trazo original y la simulación sobrepuesta, con estos datos se calculó la contribución de cada especie en el espectro. Esto se ilustra con las barras de colores.

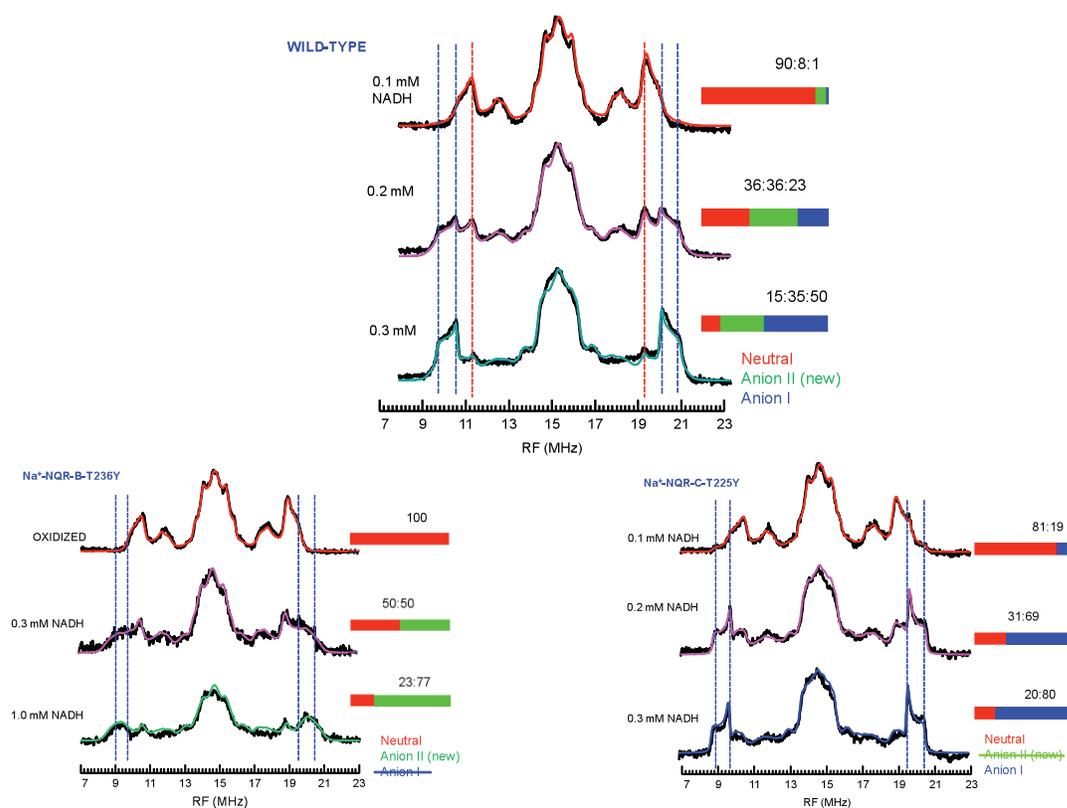


Figura 11. Espectros de ENDOR a diferentes concentraciones de NADH de las cepas silvestre y de las mutantes NqrB-T236Y y NqrC-T225Y, mostrando los diferentes radicales aniónicos. Las barras de colores indican las proporciones de cada radical en la muestra. Los espectros están en negro mientras que las simulaciones de cada uno se presentan a colores.

La presencia de riboflavina como cofactor de la Na^+ -NQR fue descrita inicialmente por nuestro grupo en 2003. La riboflavina es la molécula precursora del FMN y del FAD, los cuales funcionan como cofactores en la mayoría de flavoproteínas, por lo que la presencia de riboflavina en Na^+ -NQR es única. Sin embargo, la presencia de la cuarta flavina no fue aceptada universalmente. Nuestros estudios recientes muestran que la riboflavina es un cofactor genuino en la enzima. La doble mutante de las moléculas de FMN unidas de manera covalente (NqrB-T236Y/NqrC-T225Y) presenta dos flavinas, ambas solubles, el FAD y la riboflavina, identificadas por HPLC. Para demostrar que la riboflavina da origen al radical neutro, analizamos la doble mutante por EPR. Al reducir la enzima, el radical desaparece, lo que corrobora que la riboflavina forma el radical neutro en Na^+ -NQR. El papel de la riboflavina en el transporte de electrones fue confirmado con el siguiente experimento: NQR puede catalizar la reacción reversa de transporte de electrones, donde el ubiquinol funciona como el donador de electrones. En esta reacción el primer cofactor que se reduce es el último aceptor de electrones en la enzima. Como se ve en la Figura 12 una sola fase es observada. La absorbancia a 575 nm disminuye en función del tiempo. Esta fase es consistente con la reducción (con un electrón) de la flavina neutra a la forma reducida. Lo que indica que la riboflavina, que da origen al radical neutro, es el último aceptor de electrones en la enzima [60].

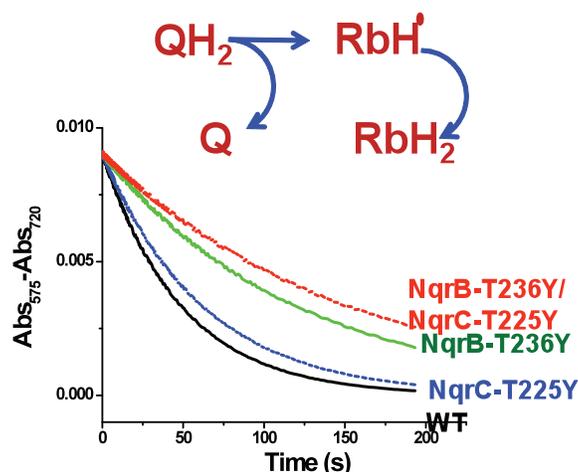


Figura 12. Cinética de reducción de Na⁺-NQR por ubiquinol. La desaparición del radical neutro se midió como la diferencia de absorbancia (575-720 nm). El quinol se usó como donador de electrones (reacción reversa). Se muestran los trazos para la cepa silvestre y varias mutantes.

Tabla II. Composición de cofactores de la Na⁺-NQR

Subunidad	Peso molecular (kDa)	Segmentos transmembranales	Cofactores	Señales de EPR
A	50			
B	35	9	FMN	Radical de flavina aniónico tipo II
			Riboflavina ¿?	Radical de flavina neutro
C	32	2	FMN	Radical de flavina aniónico tipo I
D	20	6		
E	19	6		
F	46	1	FAD 2Fe-2S	

Mecanismo de transporte de electrones

Las primeras descripciones del mecanismo por el cual la enzima transporta los electrones fue postulado por Hayashi y Unemoto [7]. En esta propuesta se consideraba que la enzima contaba únicamente con la molécula de FAD como cofactor y se pensaba que el radical orgánico encontrado en la enzima correspondía a una molécula de ubiquinona, semejante a los casos del complejo bc1 y del complejo I, en los que se había descrito que la formación de la semiquinona es esencial para el funcionamiento de la enzima, debido a que ambos complejos operan con un mecanismo similar al asa redox. De acuerdo con el modelo de Hayashi y Unemoto, la molécula de FADH se reducía al reaccionar con el NADH y posteriormente donaba un electrón a la vez a la ubiquinona, con lo cual aparecía la semiquinona. Como se había descrito que el potencial redox de el par redox FADH₂/FAD era insensible al sodio, se sugirió que

el sitio de acoplamiento podría ser el paso de la reducción de la semiquinona. Esta propuesta es similar a la de Dimroth [27] en el sentido de que la molécula de ubiquinona participa como cofactor y es transformado en una especie radical. Sin embargo, en la propuesta de Dimroth participan dos moléculas de ubiquinona y el centro 2Fe-2S. Esta modificación al modelo de Hayashi y Unemoto está basada en que se ha demostrado la presencia de cantidades estequiométricas de ubiquinona unida a la Na^+ -NQR purificada, por lo que se especuló que podría participar como cofactor de la reacción. Rich [57] propuso un modelo en el que se proponía que el centro 2Fe-2S donaba los electrones directamente a la ubiquinona, y a diferencia de los modelos anteriores el radical de la semiquinona tenía un papel secundario, ya que en este modelo la reducción y oxidación del centro 2Fe-2S estaba vinculada directamente con la captura y liberación del sodio.

El uso de estos modelos ha sido limitado debido al conocimiento que se tenía sobre la composición de los cofactores de la enzima, en particular en ninguno de los modelos anteriores se tiene en cuenta que la enzima presenta más de una molécula de flavina y que al menos dos flavinas se encuentran en forma de radical, dependiendo del estado redox de la enzima. Bogachev y Verkhovsky [61,62] postularon un modelo en el que se tomaban en cuenta los dos radicales de flavina que se habían descrito en la enzima. De acuerdo con este modelo los electrones son tomados por pares en la molécula de FAD y posteriormente viajan de uno en uno a través del centro 2Fe-2S a de las dos moléculas de FMN, la que se transforma en un radical aniónico, el electrón es capaz de pasar al radical neutro de flavina, el cual se pensaba que correspondía a la otra molécula de FMN, para finalmente ser donados a la ubiquinona. Sin embargo, la asignación de los dos radicales había quedado inconclusa. Nuestro grupo recientemente retomó el problema.

Para discernir la ruta que siguen los electrones en la enzima se diseñaron experimentos en lo que se utilizaron mutantes de los diferentes cofactores de la enzima y se analizó su actividad con ubiquinona (CoQ), la cual es el sustrato fisiológico de la enzima, y con otros aceptores artificiales de electrones, como el ferricianuro. Este análisis fue profundizado al estudiar los patrones de reducción de la enzima silvestre y de las diversas mutantes por métodos espectrofotométricos, ya que se ha descrito que los cuatro estados posibles de reducción de las moléculas de flavina, así como los dos estados redox del centro 2Fe-2S tienen espectros característicos [9,63,64].

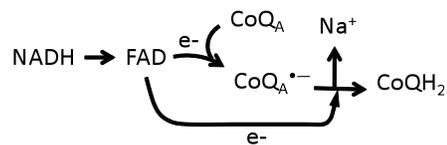
La proteína silvestre presenta cuatro fases de reducción utilizando al donador natural de electrones NADH. En la primera se reduce la molécula de FAD, y en la segunda se reduce el radical de flavina neutro (Figura 13E). La tercera y cuarta fases no forman parte del ciclo catalítico de la enzima, debido a que las constantes de velocidad de ambas fases con pequeñas comparadas con el número de recambio. Sin embargo, las dos fases finales son ilustrativas en el sentido del número y naturaleza de los cofactores involucrados. En la tercera fase se forman dos radicales aniónicos y en la última fase uno de los dos radicales desaparece, lo que concuerda con la participación de cuatro moléculas de flavina como cofactores de la enzima y con que en la forma reducida se encuentre un solo radical aniónico.

Se describió que la mutante que no presenta al FAD en la subunidad F era completamente inactiva, tanto con el sustrato natural de la enzima (CoQ) o un aceptor artificial de electrones, lo que indica que el FAD es el sitio de entrada de electrones. Esta propuesta es congruente con un modelo estructural de la subunidad F que muestra que la molécula de FAD y la molécula de NADH se encuentran cercanas.

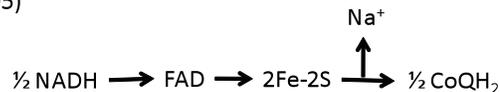
La mutante del centro 2Fe-2S es inactiva con el aceptor fisiológico de electrones, pero presenta una actividad semejante a la de la cepa silvestre con ferricianuro, lo que sugiere que en la ruta de transporte de electrones el centro 2Fe-2S está localizado después del FAD. Por su parte los estudios de cinética rápida demuestran que en esta mutante el único cofactor que se reduce es la molécula de FAD.

Las mutantes que no presentan a la molécula de FMN localizada en la subunidad B y C son completamente inactivas con CoQ y presentaron una actividad semejante a la enzima silvestre con ferricianuro. Sin embargo, la cinética de reducción de ambas mutantes es contrastante. La mutante de la molécula de FMN localizada en la subunidad B se reduce en tres fases. En la primera se reduce la molécula de FADH, en la segunda se reduce el centro 2Fe-2S junto con una molécula de FMN, que se transforma en un radical aniónico y en la tercera el radical aniónico se transforma en la especie completamente reducida (FMNH₂). Estos datos indica que el FMN localizado en la subunidad C es el aceptor de electrones del centro 2Fe-2S, los cuales en el siguiente paso son donados al FMNB. Apoyando esta hipótesis, la mutante de FMNB presentó dos fases de reducción. En la primera se reduce la molécula de FAD, mientras que la segunda fase no forma parte del ciclo catalítico de la enzima, debido a que presenta una constante de velocidad muy pequeña.

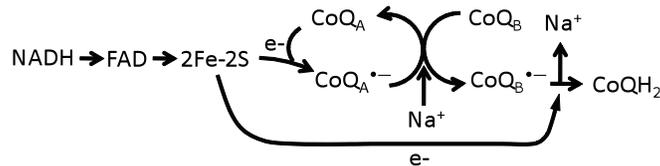
A) Hayashi and Unemoto (1984)



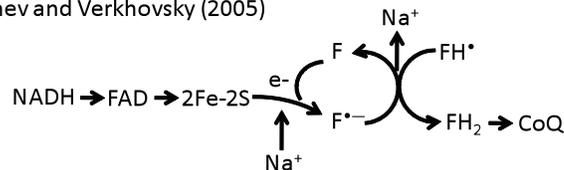
B) Rich (1995)



C) Dimroth (1997)



D) Bogachev and Verkhovsky (2005)



E) Juárez *et al.* (2009)

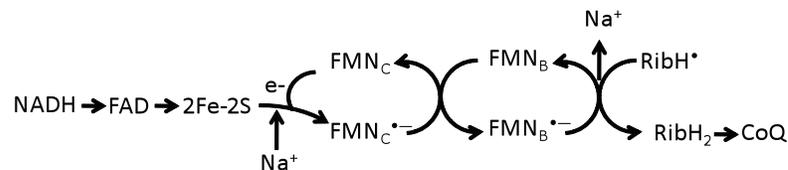


Figura 13. Modelos propuestos de transporte de electrones en Na⁺-NQR.

Considerando estos resultados se concluyó que los electrones viajan a través de la enzima a través de la siguiente ruta: FAD → 2Fe-2S → FMNC → FMNB → Riboflavina. Los estudios que se habían realizado con anterioridad apoyaban una ruta semejante, por ejemplo: Se había descrito con anterioridad que el FAD y el centro 2Fe-2S se encuentran en la subunidad F, la cual interactúa fuertemente con la subunidad C. Otros estudios demostraban que el centro FMNB es capaz de interactuar con el radical neutro de riboflavina, puesto que al eliminarse FMNB las propiedades del radical neutro se modificaban.

Referencias

1. Rich, P.R. (2008) *J Bioenerg Biomembr.* **40**, 407-410.
2. Dibrov, P.A., et al. (1986) *Biochim Biophys Acta.* **850**, 449-457.
3. Dibrov, P.A., et al. (1986) *Biochim Biophys Acta.* **850**, 458-465.
4. Unemoto, T., Tokuda, H. y Hayashi, M. (1990) In *Bacterial Energetics*, T.A. Krulwich, Editor, Academic Press: San Diego, California. p. 33-54.
5. Dimroth, P. (2008) *Results Probl Cell Differ.* **45**, 153-184.
6. Padan, E., Tzuberly, T., Herz, K., Kozachkov, L., Rimon, A. y Galili, L. (2004) *Biochim Biophys Acta.* **1658**, 2-13.
7. Hayashi, M., Nakayama, Y. y Unemoto, T. (2001) *Biochim Biophys Acta.* **1505**, 37-44.
8. Bogachev, A.V. y Verkhovsky, M.I. (2005) *Biochemistry (Mosc).* **70**, 43-149.
9. Barquera, B., et al. (2002) *Biochemistry* **41**, 3781-3789.
10. Béjà, O., L. Aravind, E.V. Koonin, M.T. Suzuki, A. Hadd, L.P. Nguyen, S.B. Jovanovich, C.M. Gates, R.A. Feldman, J. L. Spudich, E.N. Spudich, y E.F. DeLong. (2000) *Science* **289**, 1902-1906.
11. Lanyi, J.K. J. (2003) *Mol. Biol.* **328**, 439-450.
12. Bryant, D.A., and Frigaard, N.U. (2006) *Trends Microbiol.* **14**, 488-496.
13. Braibant, M., Gilot, P. y Content, J. (2000) *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 449-467.
14. Dawson, R.J. (2006) *Nature Reviews Microbiology.* **443**, 180-185.
15. Xu, C., Zhou, T., Kuroda, M. y Rosen. B.P. (1998) *Biochem. J.* **123**, 16-23.
16. Economou, A. (2002) *Mol. Membrane Biol.* **19**, 159-169.
17. Carlsson, F., Stålhammar-Carlemalm, M. Flärdh, K. Sandin, C. Carlemalm, E. y Lindahl, G. (2006) *Nature Reviews Microbiology.* **442**, 943-946.
18. Cipriano, D.J., Wang, Y., Bond, S., Hinton, A., Jefferies, K.C., Qi, J. y Forgac, M. (2008) *Biochim. Biophys. Acta.* **1777**, 599-604.
19. Hinton, A., Bond, S. y Forgac, M. (2009) *Pflugers Arch.* **457**, 589-598.
20. Imamura, H., Nakano, M. Noji, H. Muneyuji, E. Ohkuma, S. Yoshida, M. y Yokoyama, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 2312-2315.
21. Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Shirouzu, M., Walker, J.E., Yokoyama, S. e Iwata, S. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 8607-8612.
22. Ferguson, S.A., Keis, S. y Cook, G.M. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 5045-5054.
23. Xu, C., Rice, W.J. He, W. y Stokes, D.L. (2002) *J. Mol. Biol.* **316**, 201-211.
24. Takeuchi, A., Reyes, N. Artigas, P. y Gadsby, D.C. (2008) *Nature Reviews Microbiology.* **456**, 413-416.
25. Boiangiu, C.D., et al. (2005) *Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 105-119.
26. Dimroth, P., Jockel, P. y Schmid, M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**, 1-14.
27. Dimroth, P. (1997) *Biochim. Biophys. Acta.* **1318**, 11-51.
28. Wendt, K.S., et al (2003) *EMBO J.* **22**, 3493-3502.
29. Gottschalk, G. (2001) *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**, 28-36.
30. Brandt, U. (2006) *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 69-92.
31. Jackson, J.B., Peake, S.J. y White. S.A. (1999) *FEBS Lett.* **464**, 1-8.
32. Trumpower, B.L. (1990) *Microbiol. Rev.* **54**, 101-129.
33. Verkhovsky MI, Verkhovskaya, M.L, Morgan, J.E, y Wikström, M. (1999) *Nature.* **400**, 480-483.
34. Simon, J., van Spanning, R.J. y Richardson, D.J. (2008). *Biochim. Biophys. Acta.* **1777**, 1480-1490.
35. Bäumer, S., et al (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17968-17973.
36. Imkamp, F., et al. (2007) *J Bacteriol.* **189**, 8145-8153.
37. Kumagai, H., et al. (1997) *Biochemistry.* **36**, 5509-21.
38. Deppenmeier, U., Müller V. y Gottschalk, G. (1996) *Arch. Microbiol.* **165**, 149-163.
39. Boiangiu, C.D., et al. (2005) *J Mol Microbiol Biotechnol.* **10**, 105-19.
40. Buckel, W. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1505**, 15-27.
41. Harms, U. et al (1995) *Eur. J. Biochem.* **228**, 640-648.
42. Friedrich, T. et al (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 305-309.
43. Weerakoon, D.R. y Olson, J.W. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 915-925.
44. Guenebaut, V. et al (1997) *J. Mol. Biol.* **265**, 409-418.
45. Kerscher, S.J. (2000) *Biochim Biophys Acta.* **1459**, 274-283.
46. Beattie, P., et al. (1994) *FEBS Lett.* **356**, 333-338.
47. Hayashi, M., Hirai, K. y Unemoto, T. (1994) *FEBS Lett.* **356**, 330-332.
48. Zhou, W., et al. (1999) *Biochemistry.* **38**, 16246-16252.
49. Backiel, J. et al (2008) *Biochemistry.* **47**, 11273-84.
50. Jouanneau, Y. (1998) *Eur J Biochem.* **251**, 54-64.
51. Wunsch, P. y Zumft, W.G. (2005) *J Bacteriol.* **187**, 1992-2001.
52. Saunders, N.F. et al (1999) *Mol Microbiol.* **34**, 24-36.

53. Hayashi, M., et al (2001) *FEBS Lett.* **488**, 5-8.
54. Nakayama, Y., et al (2000) *FEBS Lett.* **474**,165-168.
55. Barquera, B., Hase, C.C. y Gennis, R.B. (2001) *FEBS Lett.* **492**, 45-49.
56. Duffy, E.B. y Barquera, B. (2006) *J Bacteriol.* **188**, 8343-8351.
57. Bourne R.M., et al (1991) *Biochem Soc Trans.* **19**, 251S.
58. Barquera, B., et al. (2003) *J Am Chem Soc.* **125**,265-75.
59. Barquera, B. et al (2006) *J Biol Chem.* **281**,36482-36491.
60. Juárez, O. et al (2008) *J Biol Chem.* **283**, 33162-33167.
61. Bogachev, A.V. y Verkhovsky, M.I. (2005) *Biochemistry (Mosc).* **70**, 143-149.
62. Bogachev, A.V., et al (2007) *Biochemistry.* **46**, 10186-10191.
63. Barquera, B., et al (2004) *Biochemistry.* **43**, 12322-12330.
64. Juárez, O., Morgan, J.E. y Barquera, B. (2009) *J Biol Chem.* **284**, 8963-8972.

Semblanza de la Dra. Blanca Barquera



La Dra. Barquera nació de México y se graduó en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Obtuvo su Maestría en Bioquímica, también en la Facultad de Química y el Doctorado en Bioquímica con Mención Honorífica, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Ha realizado estancias posdoctorales y trabajado como investigadora en la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, Estados Unidos, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, México y en la Universidad de Helsinki, Finlandia. A partir de agosto del 2002 tiene su laboratorio en el Departamento de Biología del Center for Biotechnology and Interdisciplinary Studies, Rensselaer Polytechnic Institute en Troy, Nueva York. La Dra. Barquera ha publicado más de 40 artículos en revistas de prestigio internacionales en las áreas de bioquímica, biofísica, proteínas de membrana y fisiología bacteriana. La línea principal de investigación que actualmente desarrolla en su laboratorio es la Bioenergética del sodio en bacterias. Utilizando como modelo a la bacteria patógena *Vibrio cholerae*, sus estudios abarcan diferentes niveles, como lo es la expresión genética global, los

aspectos enzimáticos y la fisiología bacteriana.

<http://www.rpi.edu/dept/bio/faculty/profiles/barquera.html>



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXXIII**. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

CASCADAS DE MAP CINASAS EN APAREAMIENTO Y ESTRÉS EN LEVADURAS

Laura Kawasaki, Laura Ongay-Larios y Roberto Coria
Depto. de Genética Molecular. Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
rcoria@ifc.unam.mx

Resumen

Las células responden a una gran variedad de señales empleando un juego limitado de componentes intracelulares. Sorprendentemente, los sistemas que transducen diferentes señales, comparten proteínas pero evitan el entrecruzamiento erróneo. Las levaduras son en general un modelo en el cual se puede estudiar esta paradoja. Las levaduras contienen varios sistemas de transducción compuestos por MAP cinasas que comparten varios componentes. En esta revisión describimos brevemente los aspectos importantes y los componentes de los sistemas de respuesta a feromonas de apareamiento y de respuesta a estrés osmótico. Nos enfocamos en describir los componentes de los módulos de MAP cinasas y sus actividades y hacemos un resumen de los mecanismos por los cuales se consigue especificidad. Los datos actuales indican que las proteínas de andamiaje juegan un papel importante en el mantenimiento de la fidelidad.

Palabras clave: MAPK, transducción, apareamiento, estrés osmótico, levaduras.

Abstract

Cells respond to a number of signals using a limited set of intracellular components. Surprisingly, pathways that transduce different signals share protein components, yet avoid erroneous cross-talk. Yeasts are in general highly tractable model organisms in which this paradox can be studied. Yeast harbor several mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction cascades, that share multiple signaling components. In this review we describe briefly the key features and components of the yeast MAPK pathways that control the mating pheromone response and the response to osmotic stress. We focus on the components and activity of the MAPK modules and summarize some mechanisms by which specificity could be achieved. Current data indicate that scaffolding plays a key role in the maintenance of fidelity.

Keywords: MAPK, transduction, mating, osmotic stress, yeast.

Introducción

Uno de los aspectos más interesantes en la Biología Celular es conocer la manera en que las células perciben y responden adecuadamente a estímulos ambientales. Todas las células y sobre todo los organismos unicelulares de vida libre están expuestos a una gran variedad de estímulos que pueden variar en intensidad y que pueden presentarse simultáneamente. Aún así, las células no sólo deben sentir y distinguir entre estímulos de diferente naturaleza y magnitud, sino también deben transducir la señal adecuadamente para activar las respuestas apropiadas. Las células responden a una gran cantidad de señales extracelulares e intracelulares empleando un repertorio limitado de componentes de transducción. Sorprendentemente, los sistemas que transducen diferentes señales comparten varios componentes y aún así evitan entrecruzamientos erróneos, o bien, si hay entrecruzamiento, éste es moderado y regulado y puede resultar benéfico para la célula.

En las células eucariontes muchos sistemas de transducción están compuestos por proteínas sensores de los estímulos, por proteínas transductoras que internalizan la señal, y por proteínas que dirigen y propagan esta señal y regulan la respuesta celular. De estas últimas, algunas forman módulos de proteínas cinasas que se fosforilan secuencialmente (MAPKs, EC 2.7.11.24). La fosforilación de proteínas es un mecanismo general para propagar estímulos y generar respuestas celulares.

En las levaduras existen unos cinco sistemas de transducción compuestos de MAPKs (del inglés, Mitogen Activated Protein Kinases). Estas son cinasas específicas de serina y treonina que responden a estímulos extracelulares (mitógenos) y regulan varias actividades celulares, como por ejemplo, la expresión génica, la mitosis, la diferenciación y los sistemas de sobrevivencia y apoptosis [1].

En esta revisión se describen los módulos de MAPK cinasas que participan en la respuesta a las feromonas sexuales y en la respuesta a estrés hiperosmótico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y cuando se considera relevante, se describen algunas semejanzas o diferencias que existen con otras especies de hongos, especialmente *Kluyveromyces lactis*. También se revisan brevemente los componentes que reciben los estímulos de la feromona y del choque osmótico, los cuales se encuentran río arriba de los módulos y se describe el mecanismo por el cual se consigue especificidad en la respuesta y se evita el entrecruzamiento a pesar de que los dos sistemas de transducción comparten varios componentes.

MAP cinasas

Las vías de señalización de MAP cinasas presentan un módulo de 3 cinasas, conservadas evolutivamente, que se fosforilan secuencialmente una a otra (Figura 1). La MAP cinasa-cinasa-cinasa (MAPKKK) fosforila y activa a la MAP cinasa-cinasa (MAPKK) y esta a su vez fosforila y activa a la MAP cinasa (MAPK) [2].

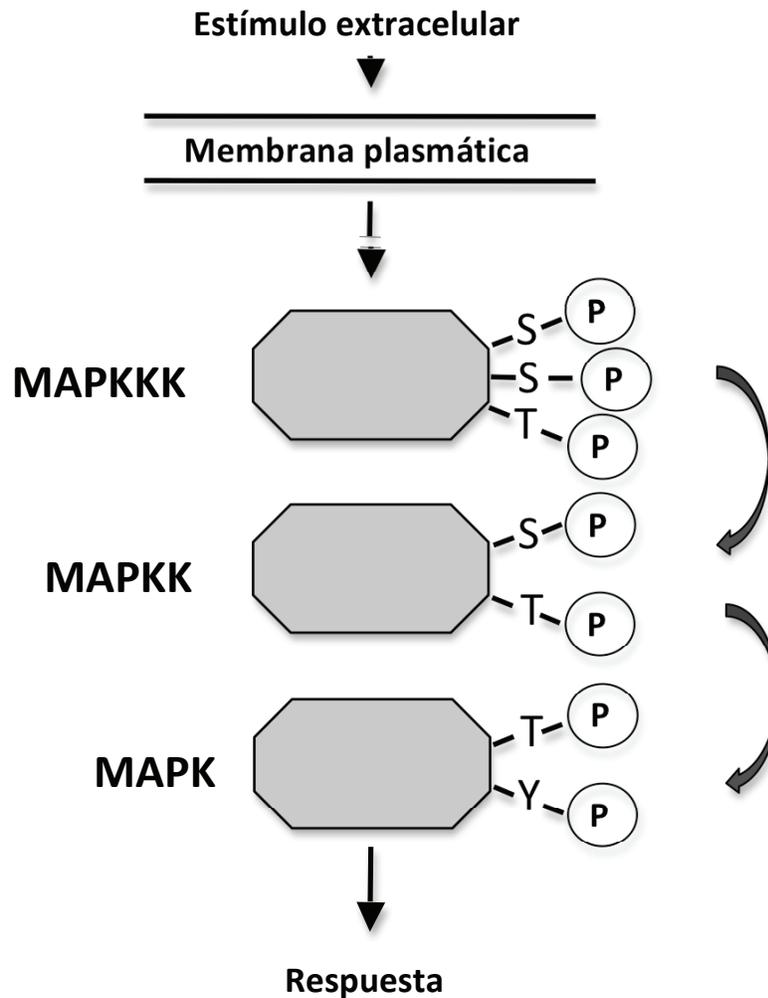


Figura1. Representación esquemática de la cascada de fosforilaciones en el módulo de MAP cinasas. La MAPKKK es sustrato de fosforilación de una o varias cinasas intermediarias entre el módulo y el estímulo. La MAPKKK fosforila a la MAPKK y esta a su vez a la MAPK. Los residuos fosforilables de serina, treonina y tirosina están conservados en la mayoría de las cinasas.

El proceso se inicia cuando la primera de ellas es activada por fosforilación por otra proteína que recibe la señal proveniente del estímulo exterior (Figura 1). La MAPKKK fosforila, y activa, a la MAPKK en una serina y una treonina que se encuentran en una región conservada en el amino terminal del dominio de cinasa. Subsecuentemente la MAPKK fosforila a la MAPK en un residuo de treonina (a veces serina) y uno de tirosina que están localizados adyacentemente y separados por un aminoácido cualquiera (Thr/Ser-X-Tyr; Figura 2). Este sitio de fosforilación está localizado en el asa de activación en el dominio catalítico (Figura 2). La doble fosforilación en la treonina y la tirosina es necesaria para la activación de la MAPK.

Normalmente la activación de la MAPK estimula su translocación al núcleo, donde fosforila residuos de serina/treonina seguidos de residuos de prolina en proteínas blanco. Sin embargo, una porción de la MAPK activada permanece en el citoplasma para mediar efectos post-traduccionales [3].

Los sistemas de cascadas de MAP cinasas son controlados negativamente por fosfatasas que actúan sobre las MAPKK y las MAPK (fosfatasas de serina-treonina) o únicamente sobre las MAPK (fosfatasas de tirosina) [4].

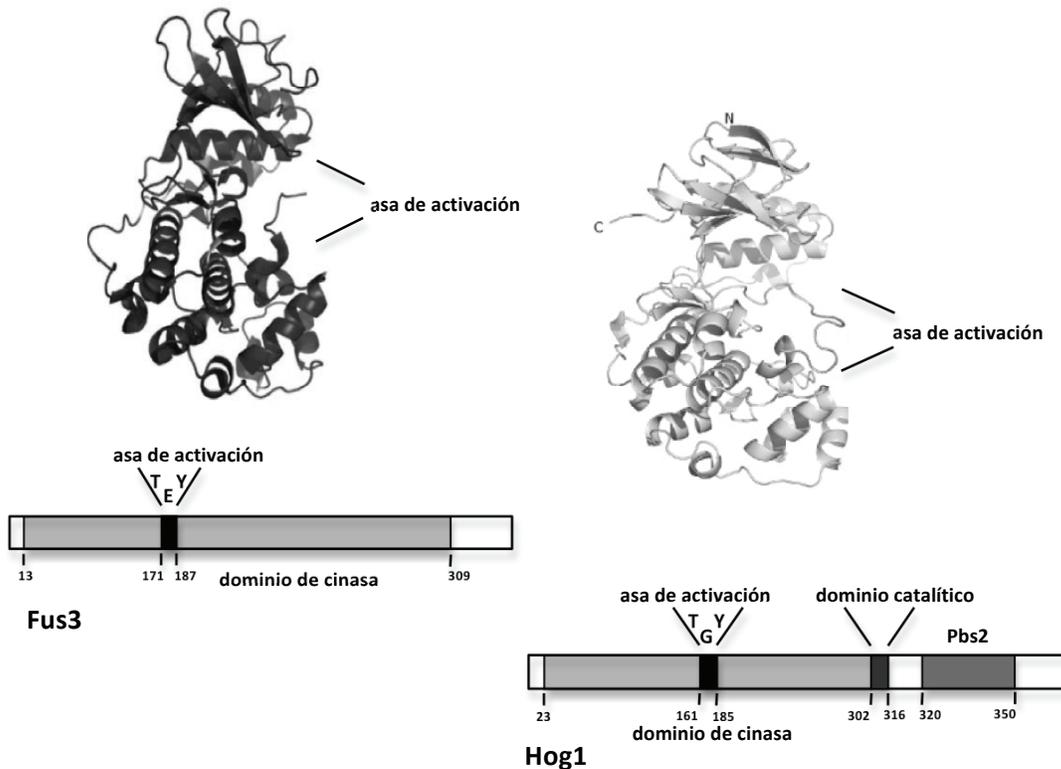


Figura 2. Estructuras de listón deducidas de los cristales de las MAPKs Fus3p y Hog1p. Se muestra la localización del asa de activación que contiene los residuos fosforilables de treonina (T) y tirosina (Y) en la estructura tridimensional de ambas proteínas. Debajo de cada estructura de listón se muestra una representación lineal de las proteínas con algunos dominios importantes. Las cajas en negro representan el asa de activación y en el caso de Hog1p también el dominio catalítico. Las cajas en gris claro representan los dominios de cinasa y la caja en gris oscuro el sitio de unión de Pbs2p en Hog1p. Los números representan posiciones de los aminoácidos que delimitan diferentes dominios. Los modelos de listón fueron tomados de [8].

En el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* hay solamente cinco genes que codifican para MAPKs [5]. Todas son proteínas estrechamente relacionadas que comparten los motivos típicos de la familia de las MAPKs eucariontes. Se piensa que estas pueden haberse originado, por duplicación génica a partir de un gen ancestral. Las cinco MAPKs se han asociado con respuestas biológicas a estímulos específicos [6]. Fus3p controla la respuesta a feromonas de apareamiento mientras que Hog1p es necesaria para la respuesta a estrés hiperosmótico (Figura 3). La cinasa Mpk1p, también conocida como Slt2p se activa por estrés hipotónico y regula la arquitectura de la pared celular. Smk1p es necesaria para el desarrollo meiótico y

Kss1p regula el crecimiento filamentoso. Es posible construir cepas que contienen deleciones de los cinco genes que codifican estas MAPKs [7].

Aunque el grado de identidad a nivel de aminoácidos no es muy alto entre las MAPK de levaduras, todas comparten homología estructural (Figura 2). La estructura deducida a partir de las formas cristalinas tanto de Fus3p como de Hog1p, se asemeja fuertemente a la estructura de la cinasa p38 de mamíferos [8]. El número de láminas β y hélices α tanto en Fus3p como en Hog1p es prácticamente el mismo y ambas presentan el asa de activación, que contiene los residuos de treonina y tirosina fosforilables, en la misma disposición (Figura 2).

Apareamiento

Las levaduras son organismos eucariontes unicelulares que en la naturaleza se pueden encontrar en estado haploide o diploide.

Las células diploides, como su nombre lo indica, tienen un juego doble de cromosomas y son ligeramente más grandes que las células haploides. En el estado haploide las células pertenecen a uno de dos sexos los cuales se conocen como *MATa* y *MAT α* [9]. Estas células contienen la misma información genética y son indistinguibles morfológicamente. La diferencia entre ellas se debe únicamente a la expresión diferencial de un grupo de genes que determinan el sexo. En las células diploides estos genes no se expresan. Una célula haploide secreta una feromona sexual que estimula a la célula del sexo opuesto y la prepara para el apareamiento. El reconocimiento de las feromonas es a través de receptores específicos localizados en la membrana plasmática. Tanto las feromonas como los receptores son específicos del sexo, con lo que se asegura que las células respondan solamente a señales apropiadas de su tipo sexual. Las células forman una proyección hacia la concentración más alta de feromona e interrumpen su ciclo celular en G1 en preparación para el apareamiento. Una vez que los pares de apareamiento están en contacto, se desintegra la pared celular y se fusionan primero las membranas plasmáticas y luego las membranas nucleares. Después de la fusión nuclear, se forma un cigoto que reinicia la división celular y crece como una célula diploide más o menos estable dependiendo de la especie [10].

Estímulo, receptores, transductores y efectores

Las feromonas sexuales (conocidas como factor α y factor **a**) son absolutamente requeridas para iniciar el proceso de apareamiento. Las células que no producen estas moléculas son estériles [11,12]. Ambas feromonas se sintetizan como precursores que se procesan y se maduran por modificaciones químicas y proteólisis. La feromona α madura es un péptido de trece aminoácidos mientras que la feromona **a** es un péptido de doce aminoácidos. Aunque existe un alto grado de identidad en las secuencias de las feromonas de diferentes especies de levaduras, hay unas pocas diferencias que hacen que estos péptidos sean específicos de la especie [12]. Las feromonas sexuales se unen y activan receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas.

Las células *MATa* expresan al receptor Ste2p que reconoce a la feromona α , secretada por la célula *MAT α* mientras que las células *MAT α* expresan el receptor Ste3p que reconoce a la feromona **a**, la cual es secretada por las células *MATa* [11,13]. El extremo amino terminal de los receptores mira al exterior y junto con porciones de las asas extracelulares forma la región de unión de la feromona, mientras que el carboxilo terminal mira al citoplasma, donde interactúa con la proteína G heterotrimérica [14]. El fenotipo de las mutantes carentes de los genes que codifican para estos receptores es de esterilidad.

La respuesta intracelular a las feromonas de apareamiento se han caracterizado exhaustivamente [15, 16]. Corriente abajo de los receptores para las feromonas se encuentra la proteína G heterotrimérica que está formada por tres subunidades: $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ (Figura 3). Las subunidades $G\alpha$ y $G\gamma$ tienen modificaciones lipídicas que les permiten anclarse en la membrana. El receptor activado por la feromona cataliza el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, la cual se disocia del dímero $G\beta\gamma$ [17]. El resultado es la activación de efectores que inducen la respuesta de apareamiento (ver abajo). Aunque los componentes de los sistemas de transducción están conservados en varias especies de levaduras, existen diferencias significativas en el mecanismo por medio del cual se propaga la señal de la feromona. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, el dímero $G\beta\gamma$ transduce la señal a efectores corriente abajo, y la subunidad $G\alpha$ regula negativamente la actividad del dímero, mientras que en *K. lactis*, tanto la subunidad $G\alpha$ como la subunidad $G\beta$ se requieren para propagar el estímulo y la subunidad $G\gamma$ es dispensable en el proceso [18,19].

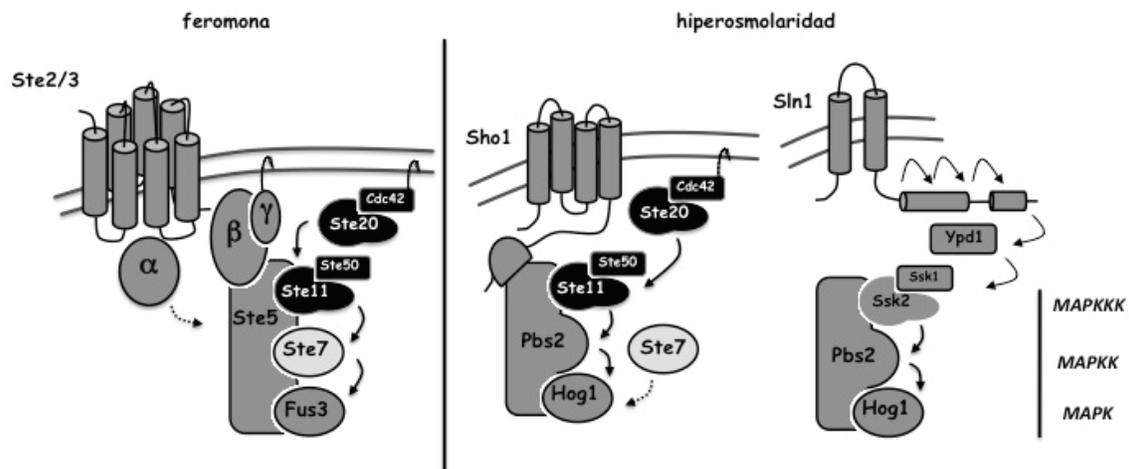


Figura 3. Componentes de las vías de transducción de respuesta a feromonas de apareamiento y de respuesta a estrés hiperosmótico en *S. cerevisiae*. En el caso de la respuesta a estrés hiperosmótico se muestran las ramas de Sho1p y de Sln1p (vía del fosforeleva). Los elementos en gris oscuro son únicos para cada una de las vías. Las proteínas compartidas por los dos sistemas están coloreadas con negro. Las flechas punteadas indican los flujos descritos en *K. lactis*. Ste7p se muestra en gris claro para indicar que sólo en *K. lactis* se ha visto su participación en estrés osmótico. Las flechas colocadas en los componentes del sistema de fosforeleva (Sln1p, Ypd1p y Ssk1p) sólo indican la dirección del flujo de fosfato y no el estado del sistema en condiciones hiperosmóticas.

Se ha visto que en diferentes especies, el dímero $G\beta\gamma$ interactúa con una serie de diferentes proteínas efectoras involucradas en el apareamiento y recluta proteínas importantes para facilitar la transmisión del estímulo (Figura 3). En primer lugar se une a una proteína de andamiaje conocida como Ste5p, acarreándola a la membrana para que ésta forme el módulo de MAPKs funcional en la respuesta. Ste5p fue la primera proteína de andamiaje descrita en eucariotes y aunque no tiene proteínas ortólogas fuera del grupo de los hongos, en mamíferos se han descrito al menos 18 proteínas de andamiaje de MAPK cinasas [20]. Ste5p interactúa y recluta a las MAP cinasas Ste11p, Ste7p y Fus3p, manteniéndolas próximas entre sí para facilitar la respuesta a feromona y colaborar en la especificidad de ésta (Figura 3). Para ser competente en la membrana plasmática y unir adecuadamente a Ste11p, Ste5p aparentemente tiene que transportarse al núcleo [21] y salir nuevamente al citoplasma. Se piensa que el proceso de entrada y salida de Ste5p del núcleo aumenta su capacidad de oligomerización, y se piensa

también que solamente los oligómeros son competentes en el sistema de señalamiento, posiblemente porque sólo así se forman los sitios de unión de G β y Ste11p.

G β se une también a la proteína Ste20p, una proteína cinasa de la familia PAK, una vez que esta ha sido activada por la GTPasa pequeña Cdc42p que se encuentra anclada a la membrana plasmática (Figura 3) [22]. Se piensa que la cinasa Ste20p activa por fosforilación al primer componente del módulo de MAPKs, Ste11p. La activación de Ste11p también ocurre por su interacción con la cinasa Ste50p (Figura 3) por medio del dominio SAM (del inglés Sterile Alpha Motif) que está presente en ambas proteínas [23].

Finalmente el dímero G $\beta\gamma$ se une al extremo amino del regulador transcripcional Far1p. La forma fosforilada de Far1p entra al núcleo donde realiza varias funciones, una de las cuales es inhibir a la ciclina CDK, lo que provoca la interrupción del ciclo celular en la fase G1.

Módulo de MAPK (componentes y actividades)

En el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento participa un módulo MAPK compuesto por las cinasas Ste11p (MAPKKK), Ste7p (MAPKK) y Fus3p (MAPK) (Figura 3).

MAPKKK: La cinasa Ste11p se encuentra unida constitutivamente a la cinasa Ste50p por medio de los dominios SAM presentes en ambas proteínas. El dominio SAM de Ste11 se encuentra localizado en su extremo amino (aminoácidos 26 a 129). En su región carboxilo terminal se encuentra localizado su dominio catalítico que tiene actividad de cinasa. Entre estas dos regiones se encuentra el sitio de interacción con la proteína de andamiaje Ste5p (del aminoácido 133 al 335). La delección de esta última región en Ste11p inactiva la vía de respuesta a feromonas. Adyacente al sitio de unión a Ste5p, se encuentra un dominio regulatorio que contiene residuos de serina y treonina fosforilables. Este dominio regula la actividad catalítica de la proteína. La sobre expresión de Ste11p induce la activación de la vía y la respuesta a feromonas aún en ausencia de Ste50p, por lo que se piensa que ésta última sirve para modular la actividad de Ste11p más que para activarla. En cambio, se ha demostrado que la cinasa PAK Ste20p, activa a Ste11p fosforilando al menos una serina y una treonina localizadas en su dominio regulatorio [15] (Figura 3). La forma activa fosforilada de Ste11p fosforila a su vez residuos de serina y treonina localizados en la cinasa Ste7p [24] (Figuras 1 y 3). Paradójicamente, no se han documentado interacciones de alta afinidad de Ste11p con su cinasa activadora Ste20p, ni con su cinasa blanco Ste7p. Aparentemente esto puede deberse a que ambas interacciones son débiles y transitorias.

MAPKK: La fosforilación, dependiente de Ste11p, de los residuos de serina y treonina localizados en el asa de activación del extremo carboxilo de Ste7p provoca su activación. Al activarse, Ste7p fosforila y activa a Fus3p, la MAPK que actúa río abajo [15] (Figuras 1 y 3). El dominio catalítico de Ste7p está localizado en su extremo carboxilo, mientras que su extremo amino contiene el sitio de unión de Fus3p. A diferencia de Ste11p, Ste7p interactúa fuertemente y de manera estable con su cinasa blanco Fus3p. Si el sitio de unión de Fus3p se elimina de Ste7p, la respuesta a las feromonas no cambia significativamente, pero si ésta mutación se combina con una que altera el sitio de unión de Ste7p a Ste5p, la respuesta a feromonas disminuye drásticamente [25]. Esto indica que las uniones que Ste7p tiene con Ste5p y con Fus3p se refuerzan mutuamente para conseguir mayor eficiencia en la transmisión del estímulo.

Se ha visto que Fus3p hiperfosforila a Ste7p en varios residuos localizados en su extremo amino y en un residuo localizado en su extremo carboxilo, lo que representa un mecanismo de regulación por retroalimentación. El resultado de la hiperfosforilación de Ste7p tiene como consecuencia que se disocie del módulo y por lo tanto, se apague la señal de la feromona [26].

MAPK: La MAPK Fus3p es la responsable de iniciar la expresión de numerosos genes específicos del apareamiento, que en conjunto, detienen el ciclo celular en G1, promueven el crecimiento polarizado hacia la célula del sexo opuesto, producen cambios en la membrana y en la pared que conllevan a la fusión entre las células y orientan al núcleo para permitir la fusión de los núcleos haploides [27]. La mutante de Fus3p tiene una reducción de un 10% a un 30% en el apareamiento, dependiendo de la especie de levadura. Esto se debe a que su ausencia se compensa con la participación de la MAPK (Kss1p) que en condiciones normales participa principalmente en la vía de crecimiento filamentoso (ver arriba). Esto quiere decir que la MAPKK Ste7p es capaz de activar no solo a Fus3p sino también a Kss1p. Ste7p fosforila los residuos de treonina y tirosina localizados en el asa de activación del dominio de cinasa de Fus3p (Figuras 1, 2 y 3). Fus3 fosforilado tiene varios blancos, entre los que se encuentran factores de transcripción como Ste12p, Dig1p y Dig2p, así como la proteína inhibidora de ciclinas Far1p. Ste12p es el principal activador de la transcripción de los genes que responden a las feromonas sexuales. Se ha visto también que Fus3p fosforila a proteínas localizadas corriente arriba como son Ste7p y Ste5p, lo que representa un mecanismo de atenuación de la respuesta.

Estrés hiperosmótico

Los mecanismos de osmoadaptación han sido ampliamente estudiados en diferentes eucariontes, en particular en varias especies de levaduras. Un cambio osmótico causa una respuesta transcripcional impresionante, al afectar la expresión de aproximadamente el 10% de los genes en la levadura. El incremento y decremento en la expresión de genes es controlado por vías de señalización que detectan el cambio osmótico y transducen la señal a la maquinaria transcripcional. Cambios en la osmolaridad del medio afectan diferentes sistemas de señalización en levaduras [4].

Uno de los mecanismos más importantes para regular la presión osmótica en las levaduras es la producción y acumulación de glicerol. Este mecanismo está parcialmente controlado por una vía de señalización de MAP cinasas, la vía de HOG (por sus siglas en inglés High Osmolarity Glycerol), que transduce la señal de alta osmolaridad y activa la respuesta apropiada.

Después de un choque hiperosmótico, las células de levadura dan una respuesta inmediata. En segundos ocurre la salida de agua intracelular y en menos de un minuto los canales de exportación de glicerol se cierran para prevenir la salida de este soluto y permitir su acumulación en la célula [28]. Al mismo tiempo, se activa el sistema de transducción mediado por Hog1p. Las respuestas primarias generadas por esta proteína son una estimulación en el transporte de iones, una interrupción transitoria del ciclo celular, una disminución de la síntesis de proteínas y la estimulación de la glicólisis para estimular la producción de glicerol [29].

La vía de HOG regula la síntesis de glicerol bajo condiciones de estrés hiperosmótico. Durante la osmoadaptación el glicerol es producido por una vía corta de la glicólisis, que consiste en dos pasos enzimáticos. La levadura *S. cerevisiae* tiene dos isoformas de cada una de las dos enzimas involucradas en esos dos pasos: Gpd1p y Gpd2p (glicerol-3-fosfato deshidrogenada) y Gpp1p y Gpp2p (glicerol-3-fosfatasa). La expresión de las isoformas Gpd1p y Gpp2p es estimulada por un choque hiperosmótico [29]. Las mutantes sencillas de *gpd1* y de *gpd2* muestran una ligera osmosensibilidad, pero la doble mutante *gpd1/gpd2* es altamente sensible [29].

La vía de HOG es una vía de MAP cinasas compuesta por Ste11p y Ssk2(22)p (MAPKKK), Pbs2p (MAPKK) y Hog1p (MAPK) (Ver Figura 3). Este módulo es alimentado por dos ramas, la rama de Sho1p y la rama de Sln1p, que convergen en Pbs2p [30] (Figura 3). Estas dos vías están compuestas de proteínas integrales de membrana (Sho1p y Sln1p), que responden a condiciones variantes de osmolaridad externa. En *S. cerevisiae*, la vía de Sho1p se activa en

condiciones de alta osmolaridad y es inactiva en condiciones iso-osmóticas, mientras que la vía de Sln1p está encendida en condiciones iso-osmóticas y se apaga en condiciones hiperosmóticas.

La rama de Sho1p

Varios de los componentes de la rama de Sho1 se comparten con otras vías de señalización, particularmente con el sistema de respuesta a feromonas de apareamiento (Figura 3). El sensor del estímulo osmótico de la rama de Sho1p aun no se conoce, pero la rama se activa a través de la proteína transmembranal Sho1p. La activación de la rama involucra la formación rápida y transitoria de un complejo proteico en la superficie de la célula. El complejo consiste de Sho1p y Pbs2p, y también involucra a otras proteínas como Ste50p, la cinasa Ste20p, la proteína G pequeña Cdc42p, y la MAPKKK Ste11 [4] (Figura 3). En estudios recientes se ha identificado una nueva proteína transmembranal que también interviene en la formación de este complejo proteico, Opy2p [31]. Estos estudios sugieren que Sho1p actúa conjuntamente con Opy2p para activar la vía de HOG.

Sho1p es una proteína que contiene cuatro dominios transmembranales y un dominio citoplásmico SH3 [32] cuya función es la de anclar a la MAPKK Pbs2p a la membrana plasmática, lo cual es un requisito indispensable para que esta vía funcione adecuadamente.

Una vez que Pbs2p se une a Sho1p se reclutan otras proteínas al complejo, la cinasa Ste20p que activa a Ste11p, la proteína G pequeña Cdc42p que recluta y activa a Ste20p y la MAPKKK Ste11p que como ya se mencionó está constitutivamente unida a Ste50p [29]. Sho1p y Pbs2p actúan como proteínas de andamiaje de todo este complejo y promueven que la cascada de señalización se dirija desde Ste11p a la MAPK Hog1p [33] (Figura 3).

Por otro lado es interesante mencionar que en algunos hongos la rama de Sho1p no parece estar involucrada en la señalización en respuesta a estrés osmótico. En *Candida albicans* por ejemplo, se ha visto que la rama de Sho1p-Ste11p participa en la regulación de la biogénesis de la pared y en la morfogénesis, y no en la adaptación a condiciones hiperosmóticas [34]. También se ha encontrado que en el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, el homólogo de Sho1p no responde a cambios en la osmolaridad [35] y en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* no se ha encontrado un homólogo de Sho1p [34]. Una serie de estudios genéticos sugieren fuertemente que en la levadura *K. lactis*, en cambio, la rama de Sho1p de la vía de HOG tiene una fuerte participación en la adaptación a condiciones hiperosmóticas [36].

Por todo lo anterior, se piensa que Sho1p puede actuar en diferentes vías de transducción por medio de asociaciones combinatorias con otras proteínas formando receptores específicos para diferentes estímulos [29].

La rama de Sln1

La rama de Sln1 de la vía de HOG es controlada por un sistema de fosforrelievo parecido al sistema de “dos componentes” de bacterias [30]. En *S. cerevisiae* el sistema de fosforrelievo está compuesto por tres proteínas Sln1p-Ypd1p-Ssk1p. Sln1p, una cinasa de histidinas transmembranal, es el osmosensor, Ypd1 es una proteína de fosfotransferencia y Ssk1p es un regulador de la respuesta [33] (Figura 3).

La proteína cinasa Sln1p tiene dos dominios transmembranales en el extremo amino terminal, que se conectan a través de una asa extracelular de aproximadamente 300 aminoácidos. Se cree que el asa extracelular y los dominios transmembranales detectan los cambios de turgor a nivel de la membrana plasmática. En *S. cerevisiae* esta proteína se activa

por hiposmolaridad y se inhibe por hiperosmolaridad, por lo que la rama de Sln1p regula negativamente a la vía de HOG en condiciones de hiperosmóticas (Figura 3).

En condiciones de baja osmolaridad, Sln1p se autofosforila en la histidina 576, y luego este fosfato se transfiere al aspartato 1144 localizado en el dominio aceptor de Sln1p. Se ha demostrado que el fosforrelevo puede ocurrir entre diferentes moléculas de Sln1p [4]. Posteriormente el fosfato se transfiere a la histidina 64 de Ypd1p y luego al aspartato 554 de Ssk1p. En condiciones de estrés hiperosmótico, no hay transferencia de fosfato y Ssk1p se encuentra desfosforilada. Esta es la forma activa de Ssk1p que interactúa y activa a la MAPKKK Ssk2p, promoviendo la activación de la MAPK Hog1p a través de la activación de la MAPKK Pbs2p (Figura 3). Tanto Sln1p como Ypd1p funcionan como reguladores negativos de la vía. La delección de los genes de estas proteínas causa letalidad debido a una sobre-activación de la vía de HOG [4], mientras que mutantes *ssk1* son sensibles a estrés hiperosmótico.

A diferencia de *S. cerevisiae*, en *K. lactis* la rama de Sln1p es un sistema de respuesta positivo en el vía, lo que implica que en condiciones de estrés hiperosmótico, esta rama está activa, es decir ocurre la cascada de fosforilaciones que activan al regulador de la respuesta Ssk1p, y contrario a lo que sucede en *S. cerevisiae*, la cinasa Ssk1p fosforilada activa a la MAPKKK, Ssk2p, del módulo de cinasas. La interrupción de cada uno de los 3 genes del sistema de fosforrelevo genera mutantes viables que muestran una moderada sensibilidad al estrés hiperosmótico.

Algunos estudios indican que en la levadura *C. albicans* se expresa un homólogo de Ssk2p que participa en respuesta a estrés hiperosmótico pero cuya activación es independiente de un sistema de fosforrelevo, lo que sugiere que esta especie tiene un sistema de respuesta a estrés muy diferente [34].

Módulo MAPK (Componentes y actividades)

A diferencia de lo que ocurre en la respuesta a feromonas sexuales, donde el módulo MAPK solo presenta una proteína MAPKKK (Ste11), el módulo MAPK que participa en la respuesta a estrés hiperosmótico está compuesto por dos MAPKKKs, una dependiente de la vía Sln1p (Ssk2p) y otra dependiente de la vía Sho1p (Ste11p). Ambas MAPKKKs activan a Pbs2p, que actúa no sólo como MAPKK, sino también como proteína de andamiaje de las MAPKKKs y de la única MAPK que en este caso es Hog1p [29].

MAPKKK: En *S. cerevisiae* hay dos proteínas que juegan el papel de MAPKKK durante la respuesta a estrés hiperosmótico: Ste11p (la misma de la respuesta a feromonas de apareamiento) y Ssk2p (existe también en *S. cerevisiae* Ssk22p, que es una cinasa redundante de Ssk2p). Cada una de estas MAPKKK se activa por una de las ramas que alimentan la vía de HOG. Ste11p es dependiente de la vía Sho1p y Ssk2p es dependiente de la vía de fosforrelevo de Sln1p (Figura 3). Aunque no se ha demostrado directamente, es muy probable que la unión de alguna de estas MAPKKKs a Pbs2p prevenga la unión de la otra, ya que sus sitios de interacción se sobrelapan parcialmente [37] (Figura 4).

La MAPKKK Ste11p, en complejo con Ste50p, se activa por la acción de Ste20p, en analogía con lo que ocurre en la respuesta a las feromonas sexuales (Figura 3). La participación de Ste11p en la respuesta al estrés osmótico se da por las interacciones específicas que tiene tanto con Sho1p como con Pbs2p. Sin embargo, se ha observado que en *S. cerevisiae*, Ste11p puede ser activado por choque osmótico de manera independiente de Sho1p [4]. En *K. lactis*, la sensibilidad a estrés osmótico de una mutante *ste11*, es varios órdenes de magnitud más fuerte que el de una mutante *sho1*. Estas observaciones parecen indicar que existen otras ramas de activación de la vía de HOG.

En *S. cerevisiae* la MAPKKK Ssk2p por su parte, interactúa con la forma no fosforilada de la proteína reguladora de la respuesta del sistema de fosforeserva Ssk1p. Esta interacción conduce a la activación de Ssk2 por fosforilación de sus residuos de serina y treonina (Figura 1). Ssk2p en su forma fosforilada es capaz de fosforilar a Pbs2p en los mismos sitios donde la fosforila Ste11p (ver arriba). Una actividad adicional que presenta Ssk2p es su participación en el rearrreglo del citoesqueleto de actina después de un estímulo hiperosmótico [38].

MAPKK: Como ya se mencionó, Pbs2p además de ser una proteína de andamiaje para los otros componentes del módulo de MAPK también tiene la función de MAPKK sobre la MAPK Hog1p. Pbs2p se activa por fosforilación dependiente de Ste11p (rama de Sho1p) y dependiente de Ssk2p (rama de Sln1p) (Figura 3). Se ha demostrado que para que Pbs2p sea fosforilada por Ste11p, se requiere su interacción con la proteína membranal Sho1p, que en este caso funciona como proteína de andamiaje. Pbs2p interactúa a través de una región rica en prolinas localizada en su extremo amino terminal con un dominio SH3 localizado en extremo carboxilo hidrofóbico de Sho1p (Figura 4). Se ha visto que la activación de Pbs2p y la posterior fosforilación de la MAPK Hog1p, provocan una disociación del complejo proteico lo que permite a la cinasa Hog1p cumplir con su papel tanto en núcleo como en citoplasma.

Mediante análisis genéticos y bioquímicos se encontró que la MAPKK Ste7p participa también en la adaptación al estrés hiperosmótico en la levadura *K. lactis*, mientras que en *S. cerevisiae* se ha visto que Ste7p sólo participa en la respuesta a feromonas sexuales y en crecimiento filamentoso. El mecanismo mediante el cual Ste7p participa en la vía de HOG es incierto, pero probablemente lo haga de manera dependiente de la rama de Sho1 mediante una interacción directa con Hog1p que permite potenciar la fosforilación de esta proteína. Sin embargo en esta especie de levadura, Ste7p no reemplaza a Pbs2p, ya que en una mutante carente de ésta última, no hay activación de Hog1p y por tanto se genera un fenotipo de hipersensibilidad a estrés osmótico [36].

MAPK: Hog1p es el homólogo en levadura de la cinasa p38 de mamíferos. p38 es un miembro del complejo de cinasas activado por estrés (SAPK) y juega un papel importante en la respuesta inflamatoria y en la respuesta a estrés osmótico.

Hog1p se activa en respuesta a la fosforilación de los residuos de treonina y tirosina del motivo TGY el cual está conservado en muchas proteínas MAPK (Figuras 1 y 2). La doble fosforilación de Hog1p es dependiente de Pbs2p y provoca una marcada acumulación de Hog1p en el núcleo, pero una cantidad de la proteína activa también media efectos en el citoplasma [29]. En el núcleo, Hog1p se asocia a proteínas de unión a DNA para regular la transcripción de genes de respuesta al estrés hiperosmótico y se une también a componentes generales de la maquinaria de transcripción, entre otros a la RNA polimerasa.

En *S. cerevisiae* Hog1p se activa transitoriamente y se inactiva en unos 10 minutos después del estímulo. Una activación prolongada de Hog1p resulta letal para la célula (como en el caso de las mutantes de los componentes de fosforeserva), probablemente porque ocurre una acumulación excesiva de glicerol y de otros solutos. Una vez que el nivel intracelular de glicerol ha alcanzado un tercio de su nivel máximo, Hog1p se desfosforila y la expresión de genes de respuesta a estrés se atenúa [29]. Hay dos tipos de fosfatasas que actúan sobre Hog1p regulando su actividad, la fosfatasa de serina/treonina Ptc1p y las fosfatasas de tirosina Ptp2p y Ptp3p.

Cinasas compartidas y especificidad

Las vías de respuesta a feromonas y de respuesta a estrés osmótico comparten algunos de sus componentes, por ejemplo, Ste20p, Cdc42p, Ste50p, Ste11p y en algunos organismos Ste7p (Figura 3), por lo que una de los aspectos centrales en el estudio de estos sistemas de

transducción es conocer las estrategias con las cuales las células consiguen la especificidad en la respuesta a los diferentes estímulos.

Algunos de los mecanismos que se han descrito involucran la participación de las MAPKs Fus3p y Hog1p, una vez que se han activado. En el caso de Fus3p, se ha visto que fosforila al cofactor de la transcripción Tec1p, el cual inhibe al regulador de la respuesta a feromonas Ste12p (ver arriba). El resultado de esta fosforilación es la rápida degradación de Tec1p por medio de ubiquitinación [39], lo que promueve la activación de Ste12p. Las otras MAPKs presentes en levaduras son incapaces de fosforilar a Tec1p. En el caso de Hog1p, se ha visto que promueve especificidad al activar fosfatasa que específicamente desfosforilan a Fus3p y por tanto la inactivan [40], por lo que una célula que tiene el programa de respuesta a estrés hiperosmótico encendido no puede responder a feromonas sexuales.

Las proteínas de andamiaje representan un mecanismo alternativo para generar selectividad en las respuestas celulares. Como se ha mencionado, las proteínas de andamiaje unen proteínas que actúan concertadamente una sobre otra, aparentemente con la finalidad de incrementar la concentración local de las proteínas interactuantes y acelerar las reacciones de señalamiento. Lo que nos han enseñado estas proteínas es que al mismo tiempo que promueven la eficiencia en la transmisión de los estímulos, en paralelo promueven especificidad al forzar interacciones solamente entre componentes de un sistema dado. No parece coincidencia, que tanto Ste5p como Pbs2p actúen como andamios y que ambas unan componentes que se comparten con otros sistemas (Figura 4). Algunas fusiones artificiales de Ste11p con Ste5p o con Pbs2p, pueden forzar a Ste11p a actuar solamente en uno de los sistemas aquí revisados, debilitando al otro o haciéndolo incompetente. Por ejemplo, se ha visto que la fusión de Ste11p a Ste5p restringe la actividad de Ste11p solamente a apareamiento y la vía de Hog1 se ve disminuida ante un estrés osmótico [41].



Figura 4. Representación esquemática de los dominios de interacción de las proteínas de andamiaje Ste5p y Pbs2p. En Ste5p los sitios de unión de las proteínas indicadas se muestran en gris oscuro. DM representa a una región transmembranal. En Pbs2p el sitio de unión de Ste11p se muestra en gris claro. Tanto los sitios de unión para las otras proteínas como el dominio de cinasa se presentan en gris oscuro.

En la Figura 4 se muestra un esquema lineal de las proteínas de andamiaje de la respuesta a feromonas y de estrés osmótico y los sitios donde se unen las proteínas que forman los módulos de MAP cinasas en cada una de ellas. El reclutamiento de las cinasas por las proteínas de andamiaje es probable que tenga tres objetivos: primero, ayudan a localizar a las cinasas en la membrana plasmática y con esto hacen más eficiente la cascada de fosforilación; segundo, confieren a las proteínas la conformación adecuada para que puedan ser fosforiladas por sus cinasas interactuantes; tercero, al unir a varias cinasas al mismo tiempo, hacen mucho más eficiente la transmisión del estímulo y promueven una respuesta más rápida.

Perspectivas

Es de gran importancia en Biología conocer los elementos que forman los sistemas de señalamiento y entender sus actividades y relaciones jerárquicas. Con un repertorio ciertamente limitado de proteínas, la célula genera los mecanismos que direccionan, y que amplían o restringen el flujo de información en su interior. Estos mecanismos son críticos para generar respuestas adecuadas; sin embargo, aún en un modelo que puede ser manipulado con relativa facilidad como lo es la levadura, estamos apenas empezando a entender los mecanismos por los cuales se asegura la fidelidad de las respuestas a estímulos que varían en naturaleza y en intensidad. La aplicación de nuevos métodos y enfoques de estudio derivados de la gran cantidad de información que se ha generado por el conocimiento de los genomas es en el futuro inmediato uno de los caminos a seguir por los investigadores interesados en el conocimiento de los sistemas de transducción.

Referencias

1. Pearson, G., Robinson, F., Beers-Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. y Cobb, M. H. (2001) *Endocr. Rev.* **22**, 153-183
2. Schwartz, M. A. y Madhani, H. D. (2004) *Annu. Rev. Genet.* **38**, 745-48
3. Toone, W. M. y Jones, N. (1998) *Genes Cells.* **3**, 485-498.
4. Hohmann, S. (2002) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 300-372
5. Hunter, T. y Plowman, G. D. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 18-22
6. Herskowitz, I. (1995) *Cell* **80**, 187-197
7. Madhani, H. D., Styles, C. A., y Fink, G.R. (1997) *Cell* **91**, 673-674
8. Modi, A., Weiner, J. y Ramanathan, S. (2009) *Nature Cell Biol.* Published online
9. Lindegren, C. C. y Lindegren, G. (1943) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **29**, 306-310
10. Herman, A., y Roman, H. (1966) *Genetics* **53**, 727-740.
11. Sprague Jr. G. F. (1991) *Trends Genet* **7**, 393-398
12. Ongay-Larios, L., Navarro-Olmos, R., Kawasaki, L., Velázquez-Zavala, N., Sánchez-Paredes, E., Torres-Quiroz, F., Coello, G. y Coria, R. (2007) *FEMSYeast Res.* **7**, 740-747
13. Torres-Quiroz, F., Kawasaki, L., Rodríguez-González, M., Patrón-Soberano, A. and Coria, R. (2007) *Yeast* **24**, 17-25
14. Naider, F. y Becker, J. M. (2004) *Peptides* **25**, 1441-1463
15. Bardwell, L. (2004) *Peptides.* **25**, 1465-1476
16. Coria, R., Kawasaki, L., Torres-Quiroz, F., Ongay-Larios, L., Sánchez-Paredes, E., Velázquez-Zavala N., Navarro-Olmos R., Rodríguez-González M., Aguilar-Corachán R. y Coello G. (2006) *FEMS Yeast Res.* **6**, 336-344
17. Dietzel, C., y Kurjan, J. (1987) *Cell* **50**, 1001-1010
18. Saviñón-Tejeda, A., Ongay-Larios, L., Valdés-Rodríguez, J. y Coria, R. (2001) *J.Bacteriol* **183**, 229-234
19. Kawasaki, L., Saviñón-Tejeda, A. L., Ongay-Larios, L., Ramírez, J. y Coria, R. (2005) *Yeast* **22**, 947-956
20. Morrison, D. K., y Davis, R. J. (2003) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 91-118.
21. Mahanty, S. K., Wang, Y., Farley, F. W. y Elion, E. A. (1999) *Cell* **98**, 501-512
22. van Drogen-Petit, A., Zwahlen, C., Peter, M. y Bonvin, H. (2004) *J. Mol. Biol.* **336**, 1195-1210
23. Pryciak, P. M. y Huntress, F. A. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2684-2697
24. Neiman, A. M. y Herskowitz, I. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3398-3402
25. Bardwell, A. J., Flatauer L. J., Matsukuma, K., Thorner, J. y Bardwell, L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10374-10386
26. Maleri, S., Ge, Q., Hackett, E. A., Wang, Y., Dohlman, H. G. y Errede, B. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 9221-9238
27. Chen, R. E. y Thorner, J. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 353-404
28. Tamás, M. J., Luyten, K., Sutherland, F.C., Hernández, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B. A., Kilian, S. G., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, J.M. y Hohmann, S. (1999) *Mol. Microbiol.* **31**, 1087-1104
29. Hohmann, S., Krantz, M. y Nordlander, B. (2007) *Methods Enzymol.* **428**, 29-45
30. O'Rourke, S. M., y Herskowitz, I. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2874-2886
31. Wu, J. J. y Bennett A. M. J. (2005) *J. Biol. Chem.* **22**, 16461-16466

32. Maeda, T., Takekawa, M. y Saito, H. (1995) *Science* **28**, 554-558
33. Posas, F. y Saito, H. (1997) *EMBO J.* **17**, 1385-1394
34. Cheetham, J., Smith, D. A., da Silva Dantas, A., Doris, K. S., Patterson, M. J., Bruce, C. R. y Quinn, J. (2007) *Mol. Biol. Cell* **18**, 4903-4614
35. Fukukawa, C., Tanuma, N., Okada, T., Kikuchi, K. y Shima, H. (2005) *Cancer Lett.* **26**, 155-160
36. Kawasaki, L., Castañeda-Bueno, M., Sánchez-Paredes, E., Velázquez-Zavala, N., Torres-Quiroz, F., Ongay-Larios, L. and Coria, R. (2008) *Eukaryotic Cell* **7**, 78-85
37. Tatebayashi, K., Takekawa, M. y Saito, H. (2003) *EMBO J.* **22**, 3624-3634
38. Yuzyuk, T., Foehr, M. y Amberg, D. C. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 2869-2880
39. Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C.T., Hannett, N. M., Volkert, T. L., Fink, G. R. y Young, R. A. (2003) *Cell* **113**, 395-404
40. Bardwell, L., Cook, J. G., Chang, E. C., Cairns, B. R., y Thorner, J. (1996) *Mol. Cell Biol.* **16**, 3637-3650
41. Harris, K., Lamson, R. E., Nelson, B., Hughes, T. R., Marton, M. J. Roberts, C. J. Boone, C. y Pryciak P. M. (2001) *Curr. Biol.* **11**, 1815-1824

Semblanza del Dr. Roberto Coria



El Dr. Coria es Biólogo egresado de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realizó sus estudios de Maestría y Doctorado en Investigación Biomédica Básica también en la UNAM. Posteriormente realizó una estancia Posdoctoral en “Baylor College of Medicine” en Houston, TX. Y realizó una estancia sabática en “Wisconsin University” en Madison, WI. Actualmente es Investigador en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y es miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Desde sus estudios de posgrado ha trabajado en diferentes aspectos de microbiología y en especial con levaduras. Ha hecho contribuciones en el transporte de iones a través de la membrana plasmática, en genética mitocondrial y en transducción de señales.

Actualmente sus principal interés es el estudio de la relación entre los sistemas de transducción de señales y la respuesta a proteínas mal plegadas generada por estrés de retículo endoplásmico, tanto en levaduras como en la amiba social *Dictyostelium discoideum*.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LOS FACTORES DE TRADUCCIÓN TIPO EIF4E EN PLANTAS: REDUNDANCIA Y DIVERSIDAD FUNCIONAL

Ana Valeria Martínez Silva, Susana De la Torre Díaz y Tzvetanka D. Dinkova
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510
cesy@servidor.unam.mx

Resumen

El factor de inicio de la traducción eIF4E se ha conocido por mucho tiempo como la proteína que une a la estructura CAP (7mGpppG) para reclutar el mRNA al ribosoma. Importantes hallazgos sobre su estructura y función lo han situado como punto central en la regulación de la síntesis de proteínas tanto global como específica dentro de la célula. Actualmente, eIF4E es considerado como marcador de la transformación celular en múltiples tipos de cáncer y en el caso de plantas se le ha asociado con la resistencia a infecciones virales. Recientemente, se ha encontrado que eIF4E puede formar complejos diversos con otras proteínas celulares y participar en procesos diferentes al estímulo del inicio de la traducción. Asimismo, se conoce que la mayoría de organismos expresan múltiples miembros de la familia eIF4E, algunos de los cuales funcionan como factores generales de traducción pero otros pueden reprimirla a nivel de mensajeros específicos.

*En nuestro laboratorio se estudia la función de los diferentes miembros de la familia eIF4E en la planta *Arabidopsis thaliana*. Para ello utilizamos como herramienta mutantes generadas por inserción de T-DNA para cada gen tipo eIF4E, o el silenciamiento por RNA interferente que permite apagar la función de grupos de eIF4Es. Para evaluar el efecto de la ausencia de una proteína eIF4E en la expresión genética de la planta utilizamos el análisis por microarreglos de DNA a nivel de transcriptoma y traductoma (presencia de mRNAs en fracciones traduccionalmente activas como los polirribosomas). Este tipo de análisis nos ha permitido vislumbrar que algunas proteínas eIF4E muestran redundancia parcial en su función a la vez que participan de manera específica en la regulación de la expresión genética en respuesta a cambios ambientales o a señales propias del desarrollo.*

Palabras clave: Traducción, eIF4E, eIF(iso)4E, nCBP, microarreglos de DNA, *Arabidopsis thaliana*.

Abstract

Translation initiation factor eIF4E has been known for long time as the CAP (⁷mGpppG) – binding protein that recruits the mRNA to the ribosome. Important findings about its function and structure revealed its central role in global as well as specific translational control in the cell. In animals, eIF4E is considered as a genetic marker for cancer and cellular transformation, whereas in plants it is a marker for viral resistance. Recently, the discovery of a number of protein complexes formed with eIF4E uncovered unexpected non-translational roles for this protein. We also learned that most organisms express multiple eIF4E-family members, some involved in translation, but others having specialized functions including translational repression at specific mRNA level.

*Our laboratory is interested in discovering new specialized functions for the different eIF4E-family members in the model plant *Arabidopsis thaliana*. To approach this we use either T-DNA insertion mutants or specific mRNA silencing by RNA interference, to knockdown each one or in combination the plant eIF4Es. A global transcript analysis by DNA microarrays allows us to evaluate changes caused by the absence of a single eIF4E at either steady state or translationally active (polyribosome-recruited) mRNA levels. Such analysis revealed that in spite of a partial redundancy in their function, some of the plant eIF4E-family members are able to regulate specific gene expression switches according to environmental changes or developmental signals.*

Keywords: Translation, eIF4E, eIF(iso)4E, nCBP, DNA microarrays, *Arabidopsis thaliana*.

Introducción

La presencia de 7-metilguanósina-CAP (⁷mGpppG) tiene un papel fundamental en la vida del mRNA, comenzando con los procesos de transcripción y “splicing”, la exportación nuclear, la traducción, la represión por micro RNAs, y finalmente la degradación. Estos procesos son mediados por proteínas de unión a CAP, de las cuales una de las mejor estudiadas es eIF4E. Esta proteína fue descrita como un factor de inicio de la traducción y la gran mayoría de estudios sobre ella se han realizado desde el punto de vista de esta función. En los últimos años han emergido nuevas funciones para eIF4E, una particularmente interesante es que puede actuar como represor de la traducción para mRNAs específicos. Por otro lado, con la creciente disponibilidad de genomas completamente secuenciados, se ha encontrado que la mayoría de los organismos eucariontes poseen múltiples miembros de la familia eIF4E que desempeñan funciones diversas en la célula. ¿Cómo es que las proteínas eIF4E se han especializado en cierto tipo de funciones celulares, siendo su actividad principal la unión al CAP y el reclutamiento del ribosoma al mRNA? ¿Por qué cierta clase de eIF4Es se ha conservado en organismos tan distantes como plantas y animales, mientras que se encuentra ausente en hongos inferiores como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*?

El proceso de traducción

La traducción de mRNAs consta de tres etapas catalizadas por diferentes grupos de proteínas: factores de iniciación, de elongación, y de terminación. Dado que la regulación mas fuerte ocurre a nivel de iniciación, esta etapa ha sido sujeta a mayor investigación durante la última década [1]. En organismos eucariontes, el reclutamiento de un mRNA hacia el ribosoma es mediado por varias proteínas llamadas factores de inicio de la traducción (eIFs). Se requiere

de la formación de un complejo ternario eIF2•GTP•Met-tRNA_i que une a la subunidad ribosomal 40S para formar el complejo 43S. Posteriormente, se recluta el mRNA al complejo 43S para formar el complejo de iniciación 48S (Figura 1). Este paso es limitante para la iniciación en condiciones normales y establece la competencia entre los mRNAs para ser eficientemente traducidos. Los elementos *cis* del mRNA que estimulan este proceso incluyen el CAP (⁷mGpppN) 5'-terminal, la secuencia de poli(A) 3'-terminal, y elementos de entrada interna del ribosoma (IRES) en la región 5' no traducible (5'UTR) en algunos casos de RNAs virales y celulares [2]. Los factores *trans* incluyen a eIF3, la proteína que une poli(A) (PABP) y los factores eIF4. eIF3 es una proteína multimérica de 520 kDa requerida tanto para la unión de Met-tRNA_i como del mRNA. PABP es una proteína de aproximadamente 70 kDa que se une a la cola de poli(A) y forma homo-oligómeros. Los factores eIF4 consisten de eIF4A, una helicasa ATP-dependiente de 46 kDa; eIF4B, de 70 kDa que une RNA y estimula la actividad de eIF4A; eIF4E, de 25 kDa que reconoce el CAP; y eIF4G de aproximadamente 200 kDa que forma complejos con eIF4E (que en conjunto forman el eIF4F) y las demás proteínas funcionando como punto de anclaje para la formación del complejo de iniciación 48S. El complejo 48S recorre la región 5'UTR hasta encontrar el primer AUG en contexto apropiado para iniciar la traducción. Este proceso requiere hidrólisis de ATP mediado por eIF4A y por la presencia de los factores eIF1 y eIF1A [1]. Una vez encontrado el AUG, eIF5, una proteína activadora de GTPasa, junto con eIF5B, estimulan la hidrólisis de GTP por eIF2 [3]. Algunos de los factores de iniciación son separados del complejo por la subunidad ribosomal 60S para dar lugar al ribosoma 80S, y se produce la formación del primer enlace peptídico.

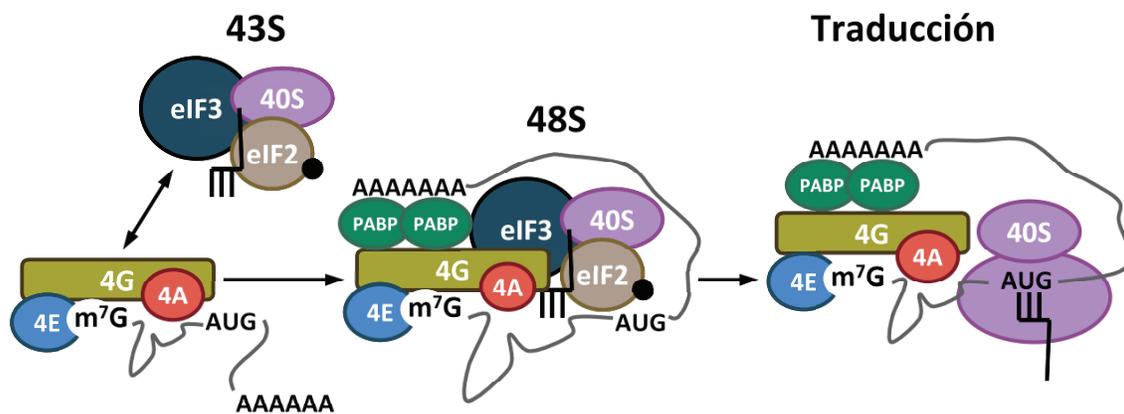


Figura 1. Inicio de la traducción CAP-dependiente en eucariotes. El tRNA-Met-eIF2-GTP une a la subunidad ribosomal 40S y a eIF3 formando el complejo 43S. El complejo de factores 4F (4E, 4G, 4A) reconoce al mRNA y mediante 4G recluta a 43S para formar el complejo 48S. Se realiza el escrutinio de la región 5'UTR hasta localizar el primer AUG en contexto apropiado. Se hidroliza GTP, se disocian varios factores y se une la subunidad ribosomal 60S para iniciar la traducción.

El factor de inicio de la traducción eIF4E

eIF4E es un factor general de inicio de la traducción que interacciona con la estructura 5' CAP del mRNA durante su reclutamiento al ribosoma. Esta proteína ha sido estudiada en múltiples organismos [4]. La comparación de secuencias y el análisis de mutantes para eIF4E en las diversas especies han demostrado una región evolutivamente conservada en la proteína que consiste en 160-170 residuos de aminoácidos ubicada entre la His-37 y la His-200 de la secuencia de eIF4E-1 de *Homo sapiens*. La secuencia consenso de esta región se resume en los residuos conservados de Trp, Phe, e His en el patrón H(x₅)W(x₂)W(x₈₋₁₂)W(x₉)F(x₅)FW(x₂₀)F(x₇)W(x₁₀)W(x₉₋₁₂)W(x₃₄₋₃₅)W(x₃₂₋₃₄)H [4]. Los extremos carboxilo y amino terminal de la

proteína son mas variables y no parecen ser relevantes para la función que eIF4E desempeña en la traducción, aunque podrían estar involucrados en la regulación de su actividad.

La estructura terciaria de eIF4E ha sido resuelta mediante cristalografía para las proteínas de ratón [5], levadura [6], humano [7] y trigo [8]. Se conoce que la interacción con CAP es debida a interacciones tipo $\pi - \pi$ de la purina alquilada entre los Trp-56 y Trp-102 (posiciones de aminoácidos de eIF4E-1 de humano). Un tercer residuo de Trp (Trp-166 en eIF4E-1 de humano) interacciona con el grupo metilo en la posición N7 de la estructura CAP.

eIF4E participa en el reclutamiento del mRNA al ribosoma mediante su alta afinidad por la proteína de anclaje eIF4G [9]. La purificación de esta proteína por cromatografía de afinidad (7 mGTP-Sefarosa) en plantas y mamíferos ha indicado que se encuentra formando complejos de unión con eIF4G y eIF4A que han sido denominados como eIF4F. La interacción eIF4E-eIF4G es competida por la unión de proteínas inhibitorias (4E-BPs) que comparten un motivo de unión canónico para eIF4E, YXXXXL ϕ (donde ϕ es cualquier aminoácido hidrofóbico) [10]. Dos residuos de Trp conservados en eIF4E humano, Trp-43 y Trp-73, son relevantes para la interacción con eIF4G. La sustitución de Trp-73 por un aminoácido no aromático impide la interacción de eIF4E tanto con eIF4G, como con las 4E-BPs. La relevancia de los demás triptofanos conservados aún se desconoce.

Características de miembros de la familia tipo eIF4E

La mayoría de los genomas de organismos eucariontes existe más de una secuencia similar a eIF4E [4]. Una hipótesis al respecto es que a partir de un gen eIF4E, se han producido duplicaciones que han generado múltiples clases y subclases. Recientemente, las proteínas estructuralmente similares a eIF4E y que contienen la región de 160-170 aminoácidos conservada, han sido agrupadas en tres clases principales [4].

Los miembros pertenecientes a la clase I contienen dos residuos de Trp equivalentes a Trp-43 y Trp-56 de eIF4E-1 de humano, los cuales se encuentran presentes en todos los organismos eucariontes. Los miembros de la clase II poseen sustituciones del Trp-43 (Trp \rightarrow Tyr/Phe/Leu) y Trp-56 (Trp \rightarrow Tyr/Phe). Miembros de esta clase se han identificado en Metazoa, Viridiplantae, y Fungi pero no en ascomicetos modelo como *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. Los miembros de la clase III poseen un residuo Trp equivalente a Trp-43 de eIF4E-1 humano, pero tienen sustitución relativa a Trp-56 (Trp \rightarrow Cys/Tyr). Este grupo se encuentra principalmente en cordados. Muchos de los eIF4E de protistas no han sido caracterizados y muestran secuencias mas compactas que las prototipo, por lo cual se ubican aparte de esta clasificación [4].

Los eIF4E canónicos son capaces de unir el CAP, a eIF4G, o a las 4E-BPs. A partir del descubrimiento de nuevos miembros de la familia eIF4E, se conoce que estas propiedades no son estrictamente conservadas en todos. Por ejemplo, en mamíferos el eIF4E-1 (Clase I) puede unir a CAP, a eIF4G y a 4E-BPs, eIF4E-2 (Clase II) solamente puede unir a CAP y a 4E-BPs, y eIF4E-3 (Clase III) solamente une a CAP y a eIF4G [11]. En el organismo *Danio rerio*, eIF4E-1B (Clase I) es incapaz de unir a cualquiera de los tres ligandos, por lo que debe tener una función particular y diferente [12]. Algunos de los miembros de la familia eIF4E presentan cambios en la especificidad de unión al CAP, como es el caso de nCBP de *A. thaliana* (Clase II) que une a 7 mGTP mas fuerte que eIF(iso)4E (Clase I) [13], y las proteínas IFE-1, -2, y -5 en *Caenorhabditis elegans* que unen tanto la versión trimetilada ($^{2,2,7}_3$ mG) como monometilada (7 mG) de la guanina en el CAP [14].

En animales, la presencia de diferentes miembros de la familia eIF4E ha sido asociada con el desempeño de funciones fisiológicas particulares, muchas de las cuales involucran

desarrollo y diferenciación. Por ejemplo, en *C. elegans* IFE-1 (Clase I) se expresa específicamente en línea germinal, forma parte de complejos ribonucleoprotéicos (gránulos P) y es requerido para la espermatogénesis [15]. Otro factor, IFE-4 (Clase II), se expresa preferentemente en neuronas, músculo y espermateca, es requerido para el ciclo reproductivo normal del organismo y para la traducción eficiente de un grupo pequeño de mRNAs [16]. Un tercer factor, IFE-2 (Clase I), se expresa en tejidos somáticos y participa en la traducción global de proteínas; sin embargo, en su ausencia se incrementa la longevidad y la resistencia al estrés oxidativo [17]. En *Drosophila melanogaster* 4E-HP, otro miembro de la Clase II, es capaz de unirse al CAP pero no a eIF4G, interacciona con proteínas que se asocian a la región 3'UTR del mRNA *caudal* y así reprime su traducción [18]. Este mecanismo de regulación es parte del establecimiento del patrón anterior – posterior durante el desarrollo embrionario de la mosca.

Los factores miembros de la familia eIF4E en plantas

En plantas, se han encontrado tres miembros de la familia eIF4E: eIF4E ó p26, que pertenece a la Clase I y es ortóloga de eIF4E-1 de mamíferos; eIF(iso)4E ó p28 también perteneciente a la Clase I, y comparte alrededor del 50% de identidad a nivel de aminoácidos con eIF4E; y nCBP, de la Clase II, que tiene ortólogos en mamíferos, nematodos, e insectos. Las proteínas eIF4E y eIF(iso)4E han sido estudiadas en varios tipos de plantas: trigo, arroz, maíz, tabaco, *Arabidopsis* y otras. Cada una de estas proteínas forma complejos diferentes mediante su interacción con las correspondientes proteínas eIF4G de 200 kDa y eIF(iso)4G de 86 kDa que se denominan eIF4F y eIF(iso)4F [19]. eIF4E y eIF(iso)4E presentan selectividad en el reconocimiento de estructuras CAP mono y di-metiladas [20], en la distribución tisular durante el desarrollo de las plantas [21; 22] y en su interacción con proteínas de algunos virus de plantas [23]. nCBP fue reportada como proteína novedosa de unión a CAP en 1998, pero aún no se conoce su función en las plantas [13].

eIF4E y eIF(iso)4E se expresan diferencialmente durante la germinación en los ejes embrionarios de maíz [22] y son capaces de traducir *in vitro* de manera diferencial el grupo de RNAm almacenados en el eje embrionario de maíz [24]. En plantas, la abundancia de eIF(iso)4E es mayor en embriones y meristemos (tejido en activo crecimiento), mientras que eIF4E es ubicuo a lo largo del desarrollo. Estos datos y los estudios *in vitro* realizados previamente con estas proteínas indican que probablemente desempeñan una función específica en las plantas. Sin embargo, mutantes en eIF4E o eIF(iso)4E en la planta modelo *A. thaliana* y en otras especies vegetales son viables y no muestran un cambio evidente en el fenotipo [25; 26]. Esto sugiere que estas proteínas también muestran cierta redundancia en su función.

Por otra parte, a partir de mutantes identificadas en diversas especies, ha surgido un creciente interés en eIF4E y eIF(iso)4E como marcadores de resistencia a la infección viral en plantas [23]. La función de estos factores en el ciclo del RNA viral es mediado por su interacción con una proteína específica (VPg; viral genome linked protein) que se encuentra en el extremo 5' del RNA en lugar del CAP. Los estudios revelan que hay especificidad de cada planta hospedero para el requerimiento de uno de los factores eIF4E ó eIF(iso)4E, ó de ambos, dependiendo del virus que la ataca. En este caso, se ha propuesto que eIF4E o de eIF(iso)4E pueden participar tanto en la traducción como en el movimiento o estabilidad del RNA viral.

La otra proteína tipo eIF4E de plantas, nCBP, que pertenece a la clase II, ha sido muy poco estudiada. De esta proteína sólo se cuenta con un trabajo que reporta su existencia y características fisicoquímicas principales [13]. Entre estas se ha determinado que se une a CAP con mayor afinidad que las proteínas eIF4E y eIF(iso)4E, es capaz de interactuar con eIF4G y eIF(iso)4G en análisis de doble híbrido y puede actuar como un verdadero factor de inicio de la traducción ya que soporta la traducción *in vitro* en ausencia de eIF4E y eIF(iso)4E.

Papel de eIF(iso)4E en la traducción selectiva de mRNAs

Considerando la aparente controversia sobre la función de eIF4E y eIF(iso)4E en las plantas decidimos analizar a nivel molecular una mutante de *A. thaliana* carente del factor eIF(iso)4E, *AteIF(iso)4E-1* [25]. En particular, abordamos la traducción de mRNAs en la planta mutante utilizando microarreglos de DNA que contienen todo el genoma de *A. thaliana* y el RNA obtenido de extractos fraccionados sobre gradientes de sacarosa (Figura 2A). Este fraccionamiento permite separar mRNAs traduccionalmente activos (ubicados en poliribosomas) de mRNAs traduccionalmente inactivos (ubicados en partículas ribonucleoprotéicas libres o monosomas). El análisis se realizó en la etapa de plántula de 15 días y se consideró para los cambios en el traductoma aquellos mRNAs que estuvieran disminuidos en poliribosomas y aumentado en monosomas o por el contrario aumentados en poliribosomas y disminuidos en monosomas en la mutante con respecto a la silvestre.

A partir de este análisis se encontraron en la mutante 81 mRNAs que disminuyeron y 48 mRNAs que aumentaron su traducción. Los mRNAs que disminuyeron su traducción en ausencia de eIF(iso)4E presentan una expresión preferencial en raíces, mientras que los que aumentaron su traducción tienen expresión preferencial en la inflorescencia de las plantas. (Figura 2, B y C). A nivel global de transcritos, también se detectaron cambios respecto a las plantas silvestres, los cuales podrían ser en parte debidos a que varios factores de transcripción se afectaron en su nivel de expresión.

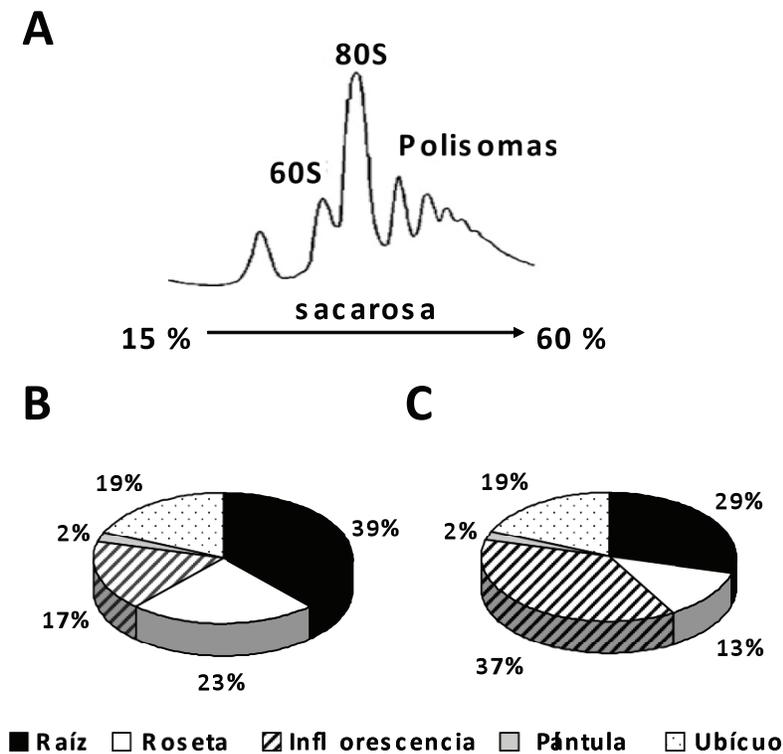


Figura 2. (A) Perfil de absorbancia a 260 nm del fraccionamiento de extractos celulares sobre gradientes de sacarosa. Se colecta el RNA de las fracciones de monosomas (80S), de poliribosomas y el RNA libre para analizarlo por microarreglos. (B) Expresión preferencial de los mRNAs que disminuyeron su traducción en la mutante *AteIF(iso)4E-1* en diversos tejidos de *A. thaliana*. (C) Análisis similar a B para los mRNAs que aumentaron su traducción en la planta mutante *AteIF(iso)4E-1*.

De los transcritos cuyos cambios traduccionales fueron comprobados por RT-PCR en tiempo real en diferentes réplicas biológicas, nos llamó la atención un transportador de fosfatos, PHO1, el cual es muy importante para la planta en condiciones limitantes de este nutriente. Este transcrito disminuye su movilización a fracciones traduccionalmente activas en ausencia de eIF(iso)4E. Dado que eIF(iso)4E no es imprescindible para la vida de la planta, es posible que su relevancia se haga más evidente en una condición de estrés como podría ser el déficit de fosfatos. En suelos deficientes en fósforo, las plantas desarrollan extensamente su sistema radicular en busca de fuentes del nutriente, mientras que el área foliar es menor comparada con plantas crecidas en presencia de fósforo [27].

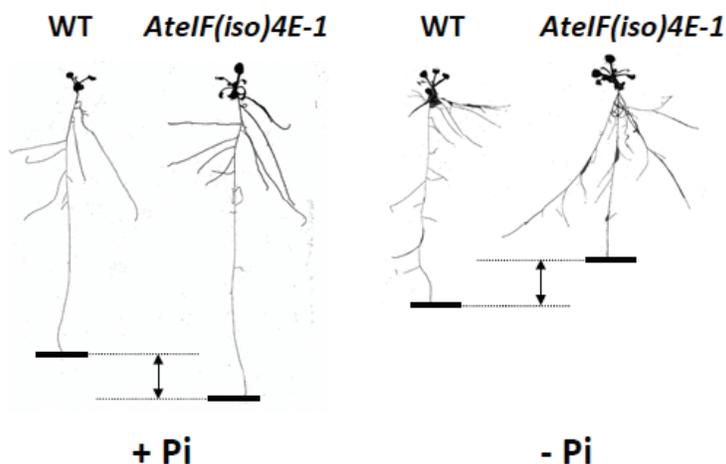


Figura 3. Análisis de la morfología de raíz en plantas silvestres (WT) y mutantes (*AtelF(iso)4E-1*). Plántulas de 15 días fueron transportadas a medio con fosfatos (+Pi) ó sin fosfatos (-Pi) durante 10 días.

Un análisis más cuidadoso permitió detectar que la longitud de la raíz principal en la planta mutante en presencia de Pi es mayor a la raíz de la planta silvestre, mientras que en deficiencia de Pi es menor a la silvestre (Figura 3). Estos resultados revelan que, a pesar de la aparente redundancia de eIF(iso)4E y eIF4E, eIF(iso)4E podría desempeñar una función especializada en la expresión de genes en la raíz, en particular durante el estrés por deficiencia de fosfatos. El fenotipo de la raíz se ha analizado exhaustivamente en el laboratorio y a pesar de que los cambios de longitud son pequeños, son estadísticamente significativos en las numerosas plantas que se han analizado. En estos momentos estamos abordando con mayor profundidad los cambios en la asimilación de fosfatos y la respuesta a la deficiencia de otros nutrientes en la planta mutante *AtelF(iso)4E-1*.

Por otro lado, se realizó un análisis bioinformático de las regiones no traducibles 5'UTR y 3'UTR de los mRNAs cuya traducción cambia en ausencia de eIF(iso)4E, encontrando que aquellos que disminuyeron su traducción tienen 5'UTR corta (menor a 100 nt) y no estructurada, mientras que los que aumentaron su traducción muestran predominancia de 5'UTR larga (mayor a 100 nt) y estructurada. Estos resultados coinciden con reportes previos que indican diferentes preferencias *in vitro* por 5'UTRs para los factores eIF4E y eIF(iso)4E de trigo [28].

Papel de nCBP en la floración de *Arabidopsis thaliana*

A 10 años del descubrimiento de nCBP [13], no se cuenta con mucha información sobre su expresión y función en *A. thaliana*. El análisis a nivel de mRNA indicó que nCBP se expresa ubicuamente en la planta, siendo más abundante en semillas, plántula y flores (Figura 4A),

mientras que acorde al proteoma recientemente liberado de esta planta, la proteína se encuentra mayoritariamente en botones florales (Figura 4B).

Recientemente, a partir de la línea de mutantes por inserción de T-DNA (SALK_131503.32.70) se obtuvo una mutante homociga nula para nCBP interrumpida en el tercer exón del gen (*Atncbp-1*). Esta mutante no expresa el mRNA completo y por consecuencia la proteína nCBP. Asimismo, acorde se reveló por análisis de *Southern blot*, la inserción de T-DNA solo se presenta en nCBP y no en otro sitio del genoma de *A. thaliana*. Las plantas mutantes presentan un desarrollo similar al observado en plantas silvestres, a excepción de un retraso en el tiempo de floración por 10 días aproximadamente. Dado que el proceso de floración es uno de los eventos de desarrollo más ampliamente estudiado desde el punto de vista genético en *A. thaliana*, el fenotipo observado se analizó con mayor profundidad.

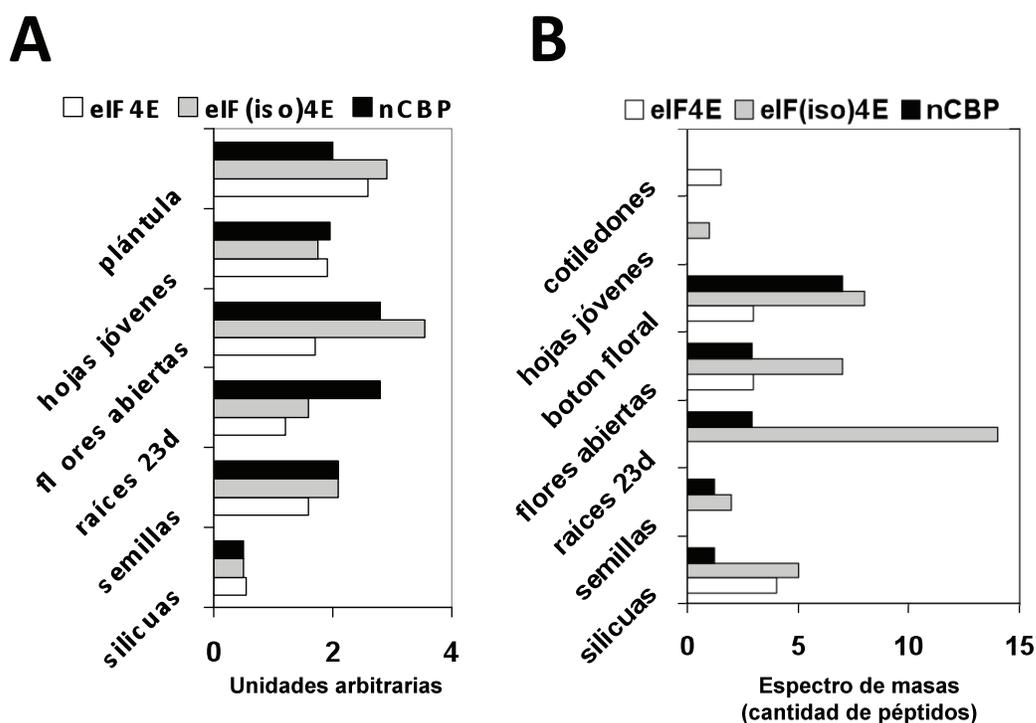


Figura 4. Expresión de los diferentes miembros de la familia eIF4E a lo largo del desarrollo de *A. thaliana*. (A) Niveles de mRNA; (B) Niveles de proteína acorde a AtProteome (<http://www.arabidopsis.org/>).

Utilizando mutantes que presentan retrasos en floración en *A. thaliana* se han podido discernir cuatro vías principales de señalización para promover la floración: (1) La vía del fotoperíodo; (2) La vía de las giberelinas; (3) La vía autónoma; y (4) La vía de vernalización (Figura 5; [29]). La floración consiste en cambios del programa genético del meristemo apical de la planta para convertirlo en un meristemo floral, es decir el tránsito de un estado vegetativo a un estado reproductivo. Este proceso es mediado por la expresión de genes de identidad del meristemo floral (FMI), los cuales son activados por las proteínas correspondientes a genes integradores (GI). Las cuatro vías arriba mencionadas convergen en la expresión de estos GI. Hay que notar que la vía de vernalización converge con la vía autónoma mediante la regulación del gen *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*).

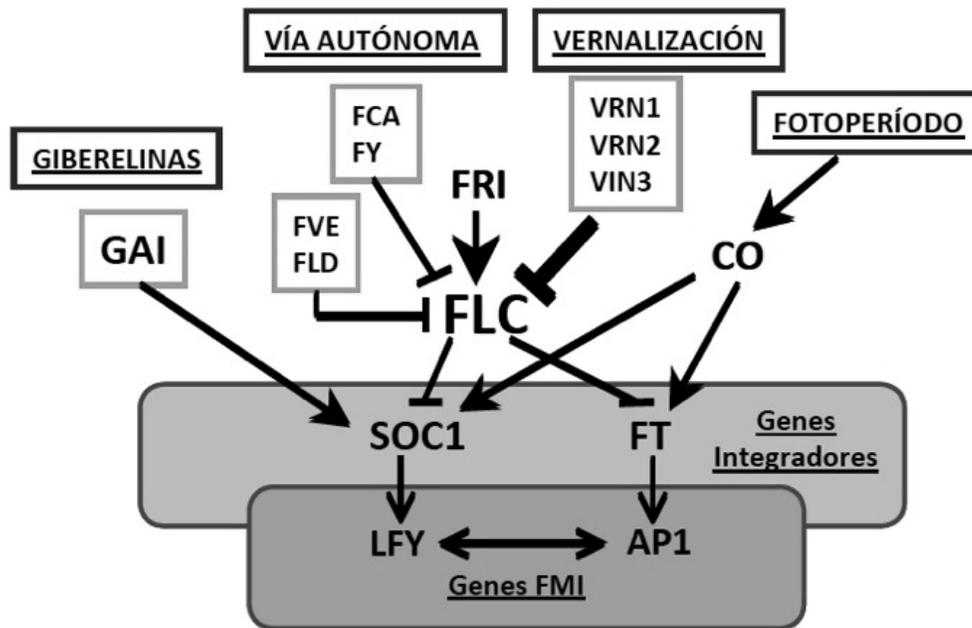


Figura 5. Vías de señalización para la floración en *A. thaliana*.

El gen *CONSTANS* (*CO*) es el actor principal de la vía del fotoperíodo [30]. *CO* es un factor transcripcional regulado por ciclo circadiano que promueve la expresión de otro factor de transcripción *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) el cual es un GI. Las giberelinas (*GAs*) aceleran la floración en *Arabidopsis* y se encuentran menos influenciadas por los días cortos que por los días largos. Los blancos de la vía de *GAs* son los GI *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS*) y *FT*. La vía autónoma regula negativamente a *FLC*, un factor de transcripción tipo MADS box que reprime a los GI y por ende la floración. Algunos reguladores del *FLC* en la vía autónoma son *FCA*, *FY*, *FVE* y *FLD* (*FLOWERING LOCUS D*), los cuales se han identificado por mutaciones que causan retraso en la floración. Las proteínas *FVE* y *FLD* están implicadas en complejos de remodelación de la cromatina, mientras que *FCA* y *FY* son proteínas de unión a RNA y participan en la regulación post-transcripcional [31]. El proceso en el cual la floración es promovida por una exposición al frío se conoce como vernalización. La proteína *FRI* (*FRIGIDA*) promueve altos niveles de expresión de represor de la floración *FLC*, mientras que la vernalización promueve el silenciamiento mitótico estable de *FLC* por las modificaciones epigenéticas causadas por *VRN1*, *VRN2* y *VIN3* [32]. La represión de *FLC* por la vía de vernalización es dominante respecto a *FRI* y a la vía autónoma.

La mutante *Atncbp-1* mostró retraso en el tiempo de floración respecto a plantas silvestres del mismo ecotipo (*Col-0*) en las condiciones de fotoperíodo largo (DL; 16h luz × 8h oscuridad), fotoperíodo corto (DC, 8h luz × 16h oscuridad), y en presencia de ácido giberélico (*GA*). Sin embargo, al utilizar un período de vernalización (V; incubación por 6 semanas a 4°C desde germinación y posteriormente a 21°C, DL) se recuperó el tiempo de floración normal (Figura 6). Este fenotipo es similar al observado en mutantes de genes de la vía autónoma de floración. El hecho de que solamente la vernalización recuperara un fenotipo silvestre de floración en la mutante *Atncbp-1* indicó que la proteína nCBP es probablemente requerida para regular la expresión de algún(os) gen(es) involucrados en la señalización de la vía autónoma.

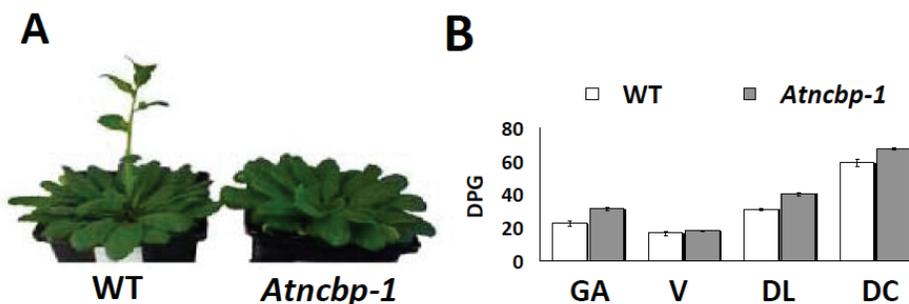


Figura 6. Fenotipo de retraso de floración en la mutante *Atncbp-1*. (A) Foto de plantas cultivadas en condiciones de fotoperíodo corto tomadas al momento de la floración de las plantas silvestres; (B) Días después de la germinación a los cuales ocurrió la floración bajo condiciones de fotoperíodo largo (DL), fotoperíodo corto (DC), presencia de giberelinas (GA), y tratamiento de vernalización (V).

Para tener evidencia molecular de que nCBP participa en la regulación de la expresión de mRNAs de genes involucrados en la vía autónoma de floración, se evaluó la expresión a nivel de mRNA de algunos genes representativos de cada una de las vías de floración. Se realizó este análisis a los días 11, 13, 16 y 18 a partir de la germinación de plantas silvestres (WT) y mutantes (*Atncbp-1*), período en el cual se produce la floración en plantas WT, bajo la condición de fotoperíodo largo a 21°C. Los resultados indicaron que en ausencia de nCBP hay menores niveles del transcrito *FCA* y mayores niveles de *FLC* (Figura 7), gen que participa tanto en la vía autónoma como en la vía de vernalización.

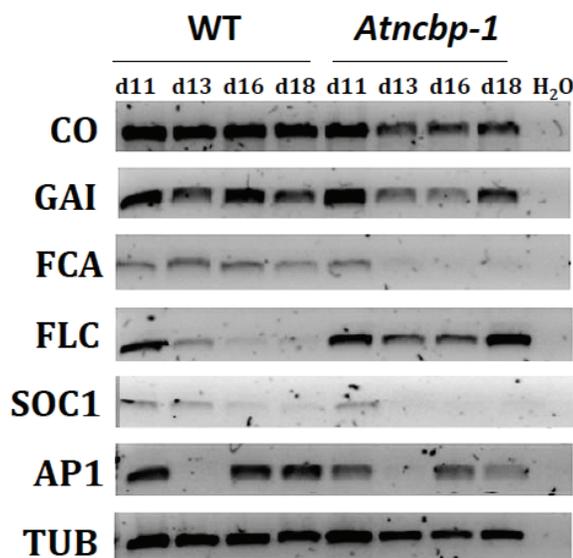


Figura 7. Expresión de genes de las diferentes vías de floración en plantas mutantes *Atncbp-1*. Análisis por RT-PCR de RNA obtenido a partir de plántulas de diferentes tiempos post-germinación en la condición DL, donde ocurre la transición de meristemo apical a meristemo floral.

También se observa una disminución en la expresión de *SOC1* y *AP1*, un gen integrador y un gen de identidad del meristemo floral, respectivamente. Por otro lado, no se observaron cambios en los genes *CO* y *GAI*, cuyas proteínas participan en las vías de fotoperíodo y giberelinas, respectivamente. En este trabajo se abordaron los niveles de transcrito porque las

proteínas correspondientes a la mayoría de los genes involucrados en floración son muy bajas en cualquier estado de desarrollo de la planta.

Las proteínas miembros de la familia eIF4E son clasificadas primordialmente como factores de inicio de la traducción, aunque pueden desempeñar también otras funciones dentro de la célula. En el caso de miembros de la Clase II, donde se ubica nCBP, se ha reportado que desempeñan funciones específicas en la regulación de la expresión genética. Para IFE-4 de *C. elegans*, se reporta que existe una regulación selectiva de algunos transcritos involucrados en la reproducción de este organismo [16] y para 4E-HP de *D. melanogaster* se reporta la unión con proteínas que unen directamente o que interaccionan con proteínas de unión a regiones 3'UTR de transcritos específicos. Estas interacciones promueven la circularización del mRNA e impiden el reclutamiento de los factores de inicio de la traducción, como eIF4F, por lo cual reprimen su traducción [18,33].

Los resultados que tenemos hasta este momento para nCBP nos permiten emitir dos hipótesis principales: (1) nCBP podría regular positivamente la traducción de uno o varios genes implicados en la transcripción de genes de la vía autónoma de floración, en particular FCA, por lo cual su ausencia redundaría en menores niveles de FCA, y por ende mayores niveles de FLC, lo que reprime la floración (Figura 8A); (2) mediante la interacción con proteínas de unión a 3'UTR, nCBP podría reprimir la traducción de uno o varios transcritos cuyas proteínas participan como represores de la vía autónoma de floración, por lo cual su ausencia redundaría en mayores niveles de estos represores y por ende un retraso en la floración (Figura 8B).

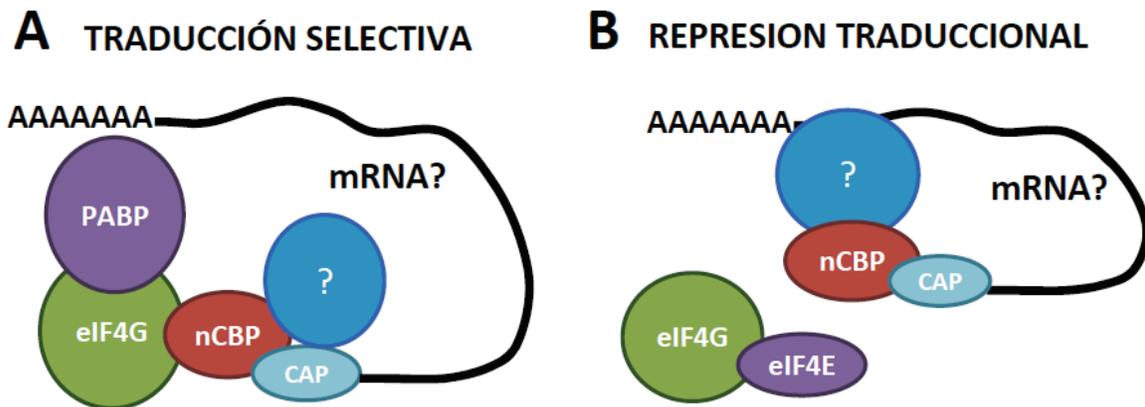


Figura 8. Modelos de regulación mediados por nCBP. (A) Traducción de un mRNA específico mediada por la unión de nCBP a CAP y a eIF4G; (B) Represión de la traducción de un mRNA específico mediada por la unión de nCBP a CAP y a una proteína que interacciona con la región 3'UTR del transcrito.

Hasta este momento dentro del grupo de genes involucrados en la vía de floración de *A. thaliana* hay múltiples factores de transcripción y algunas proteínas que participan en el procesamiento post-transcripcional de mRNAs. La proteína nCBP, es el primer factor de traducción que se relaciona específicamente con el proceso de floración. Si se analizan los niveles de mRNA para los genes de floración se observa que todos tienen una expresión ubicua [34], mientras que sus niveles de proteínas no son detectables o se encuentran solamente en ciertos momentos del desarrollo de la planta (AtProteome; <http://www.arabidopsis.org/>). Esto implica que los transcritos de genes involucrados en floración tienen una regulación post-transcripcional o incluso post-traduccional. La participación de nCBP en esta red de regulación abre nuevos caminos para estudiar los mecanismos moleculares que perciben las señales ambientales y promueven la floración de las plantas.

Perspectivas

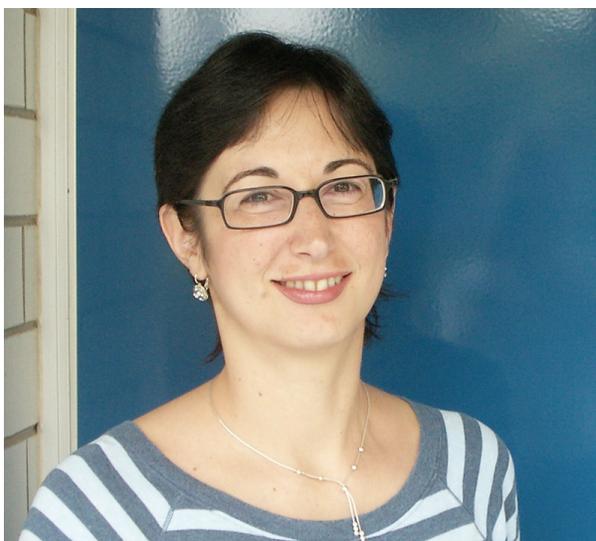
El estudio de mutantes de miembros de la familia eIF4E en plantas nos ha permitido vislumbrar algunos procesos fisiológicos donde eIF(iso)4E y nCBP desempeñan un papel específico que no podría ser sustituido por la función de otro miembro de esta familia. Esto indica una ventaja evolutiva para su conservación en las plantas, a pesar de que la presencia de múltiples factores eIF4E ha sido aprovechada por los virus para lograr un mayor éxito en los procesos de infección y propagación. El siguiente paso a seguir es entender los mecanismos moleculares que proporcionan selectividad en la función de los diferentes miembros de la familia eIF4E en plantas. Tomando en cuenta los resultados sobre la selectividad de eIF4E y eIF(iso)4E por CAPs y regiones 5'UTR adyacentes, nos proponemos abordar *in vivo* el requerimiento de eIF(iso)4E para la traducción de genes reporteros bajo las regiones 5'UTR y 3'UTR de genes como PHO1 y otros que cambiaron sus niveles de traducción en la planta mutante *AteIF(iso)4E-1*. Por otro lado, es difícil pensar que la función especializada de eIF4Es es responsabilidad directa de la interacción de estas proteínas con el CAP. En este sentido, la búsqueda de proteínas que interactúan con cada una de las proteínas tipo eIF4E de plantas, es otra de las perspectivas que tenemos para abordar la especificidad de su función.

Referencias

1. Pestova, T. V., Lorsch, J. R., and Hellen, C. U. (2007) The mechanism of translation initiation in eukaryotes. in *Translational Control in Biology and Medicine* (Mathews, M. B., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. B. eds.), CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY. pp 87-128
2. Jackson, R. J. (2005) *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1231-1241
3. Pestova, T. V., Lomakin, I. B., Lee, J. H., Choi, S. K., Dever, T. E., and Hellen, C. U. (2000) *Nature* **403**, 332-335
4. Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L., and Jagus, R. (2005) *BMC Evol Biol* **5**, 48
5. Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., and Burley, S. K. (1997) *Cell* **89**, 951-961
6. Matsuo, H., Li, H., McGuire, A. M., Fletcher, C. M., Gingras, A. C., Sonenberg, N., and Wagner, G. (1997) *Nat Struct Biol* **4**, 717-724
7. Tomoo, K., Shen, X., Okabe, K., Nozoe, Y., Fukuhara, S., Morino, S., Sasaki, M., Taniguchi, T., Miyagawa, H., Kitamura, K., Miura, K., and Ishida, T. (2003) *J Mol Biol* **328**, 365-383
8. Monzingo, A. F., Dhaliwal, S., Dutt-Chaudhuri, A., Lyon, A., Sadow, J. H., Hoffman, D. W., Robertus, J. D., and Browning, K. S. (2007) *Plant Physiol* **143**, 1504-1518
9. Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999) *Annu Rev Biochem* **68**, 913-963
10. Raught, B., and Gingras, A. C. (2007) Signalling to translation initiation. in *Translational Control in Biology and Medicine* (Mathews, M. B., Sonenberg, N., and Hershey, J. W. B. eds.), CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY. pp 369-400
11. Joshi, B., Cameron, A., and Jagus, R. (2004) *Eur J Biochem* **271**, 2189-2203
12. Robalino, J., Joshi, B., Fahrenkrug, S. C., and Jagus, R. (2004) *J Biol Chem* **279**, 10532-10541
13. Ruud, K. A., Kuhlman, C., Goss, D. J., and Browning, K. S. (1998) *J Biol Chem* **273**, 10325-10330
14. Keiper, B. D., Lamphear, B. J., Deshpande, A. M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E. J., Blumenthal, T., and Rhoads, R. E. (2000) *J Biol Chem* **275**, 10590-10596
15. Amiri, A., Keiper, B. D., Kawasaki, I., Fan, Y., Kohara, Y., Rhoads, R. E., and Strome, S. (2001) *Development* **128**, 3899-3912
16. Dinkova, T. D., Keiper, B. D., Korneeva, N. L., Aamodt, E. J., and Rhoads, R. E. (2005) *Mol Cell Biol* **25**, 100-113
17. Syntichaki, P., Troulinaki, K., and Tavernarakis, N. (2007) *Nature* **445**, 922-926
18. Cho, P. F., Poulin, F., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Chicoine, J. D., Lasko, P., and Sonenberg, N. (2005) *Cell* **121**, 411-423
19. Browning, K. S. (2004) *Biochem Soc Trans* **32**, 589-591
20. Carberry, S. E., and Goss, D. J. (1991) *Biochemistry* **30**, 6977-6982
21. Rodriguez, C. M., Freire, M. A., Camilleri, C., and Robaglia, C. (1998) *Plant J* **13**, 465-473
22. Dinkova, T. D., and Sanchez de Jimenez, E. (1999) *Physiol Plant* **107**, 419-425
23. Robaglia, C., and Caranta, C. (2006) *Trends Plant Sci* **11**, 40-45
24. Dinkova, T. D., Aguilar, R., and Sanchez de Jimenez, E. (2003) Translational control by differential CAP-dependency in selected subpopulations of maize stored mRNAs. in *The Biology of Seeds: Recent*

- Research Advances (Nicolas, G., Bradford, K. J., Come, D., and Pritchard, H. W. eds.), CAB International. pp 181-189
25. Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S., and Robaglia, C. (2002) *Plant J* **32**, 927-934
 26. Combe, J. P., Petracek, M. E., van Eldik, G., Meulewaeter, F., and Twell, D. (2005) *Plant Mol Biol* **57**, 749-760
 27. Lopez-Bucio, J., Hernandez-Abreu, E., Sanchez-Calderon, L., Nieto-Jacobo, M. F., Simpson, J., and L., H.-E. (2002) *Plant Physiol* **129**, 244-256
 28. Carberry, S. E., and Goss, D. J. (1991) *Biochemistry* **30**, 4542-4545
 29. Parcy, F. (2005) *Int J Dev Biol* **49**, 585-593
 30. Thomas, B. (2006) *J Exp Bot* **57**, 3387-3393
 31. Quesada, V., Dean, C., and Simpson, G. G. (2005) *Int J Dev Biol* **49**, 773-780
 32. Schmitz, R. J., and Amasino, R. M. (2007) *Biochim Biophys Acta* **1769**, 269-275
 33. Lasko, P., Cho, P., Poulin, F., and Sonenberg, N. (2005) *Biochem Soc Trans* **33**, 1544-1546
 34. Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., and Zimmermann, P. (2008) *Advances in Bioinformatics 2008*, 420747

Semblanza de la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova



La Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova obtuvo su Licenciatura en Bioquímica en la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana, Cuba. Posteriormente, trabajó como aspirante a investigador en el Centro Nacional de Investigación Científica de Cuba. Entre 1995 y 2000, realizó estudios de doctorado en Ciencias Bioquímicas (Ph.D.) en la Facultad de Química, UNAM y obtuvo el premio Weizmann 2000 a la mejor tesis de doctoral en Ciencias Naturales. Entre 2002 y 2004 realizó una estancia Posdoctoral en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Louisiana State University Health Sciences Center – Shreveport, LA, USA. A partir de su regreso a México en el 2004 trabaja como Profesor Asociado C en la Facultad de Química de la UNAM y es

Investigador Nacional Nivel 1. Es autora de 13 artículos científicos con arbitraje internacional y 4 capítulos en libros. Ha participado en numerosos congresos nacionales e internacionales y ha sido invitada a impartir conferencias y seminarios en diferentes foros académicos en el país y en el extranjero. Su tema de investigación actual es la regulación mediada por factores de traducción y micro RNAs en procesos del desarrollo de plantas.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXXIII**. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN PROTEÓMICA PARA LA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES

José Luis Gallegos Pérez

Laboratorio de Espectrometría de Masas, Unidad de Proteómica Médica
Instituto Nacional de Medicina Genómica. Periférico Sur 4124, Torre Zafiro 2 Piso 6
Col. Ex-rancho de Anzaldo. Del. Alvaro Obregón 01900 México, D. F. México
jgallegos@inmegen.gob.mx

Resumen

Después de la era genómica, la proteómica ha venido a revolucionar la investigación en las ciencias biológicas. El estudio del proteoma representa un reto difícil debido a que es altamente dinámico. En ciertas situaciones, las proteínas pueden estar sub- o sobre- expresadas además de sufrir modificaciones postraduccionales que alteren su función. En los últimos años, la búsqueda de biomarcadores de origen proteico ha sufrido un gran impulso debido en gran parte al desarrollo de la Espectrometría de Masas. La aplicación de esta tecnología en la proteómica y su impacto en la búsqueda de nuevos biomarcadores se describe en este artículo.

Palabras clave: Biomarcador, proteómica, proteínas, espectrometría de masas.

Abstract

After the genomic era, proteomics has coming to revolutionize the research in the biological sciences. Proteome study represents a big challenge because it is highly dynamic. In some cases, proteins can be down or up expressed in addition to undergo posttranslational modifications, which can alter their function. During the last years, especially due to the development of Mass Spectrometry, searching of biomarkers coming from proteins has had a tremendous boost. Application of Mass Spectrometry in proteomics and its impact in new biomarkers searching is described in this paper.

Keywords: Biomarkers, proteomics, proteins, mass spectrometry.

Introducción

Toda la información necesaria para construir a un ser humano completo se encuentra en cada una de nuestras células; sin embargo, no todos los genes son expresados en todas las células. Algunas células expresan determinados genes, cuyos productos, las proteínas, les proporcionan funciones celulares específicas. Existen cerca de 25,000 a 30,000 genes en el genoma humano; sin embargo, más de 500,000 proteínas se han estimado en el proteoma humano. Las proteínas son más complicadas que los ácidos nucleicos. Las proteínas pueden ser fosforiladas, glicosiladas, acetiladas, ubiquitinadas, sulfatadas y transformadas en otras formas y cada modificación le permite tener funciones distintas. Debido a que un gen puede codificar múltiples proteínas, se estima que el proteoma tiene un orden de magnitud más complejo que el genoma [1].

El término “proteoma” se le atribuye a Wilkins por usarlo por primera vez en un congreso en Siena, Italia en septiembre de 1994; aunque el término se publicó en un artículo científico hasta 1995 [2-4]. El “proteoma” se define como el conjunto de *PROTEÍNAS* expresadas por un *genOMA*. Como una extrapolación al concepto del “proyecto del genoma”, un “proyecto de proteoma” es la investigación que busca identificar y caracterizar las proteínas presentes en una célula o un tejido para definir así patrones de expresión, es decir representa finalmente al conjunto de proteínas presentes bajo condiciones específicas en un estadio determinado [5,6]. El proteoma de una célula es la expresión de su fenotipo característico, y las diferencias entre un tipo celular y otro, o entre un mismo tipo celular en diferentes situaciones, se pueden con cierta propiedad, asignar a los cambios que tienen lugar en la expresión y funcionalidad de sus proteínas. El crecimiento en el número de proyectos de investigación orientados a estudiar proteomas de forma sistemática ha dado lugar a la aparición de un nuevo concepto, “Proteómica”, con el que se trata de describir la ciencia o conjunto de tecnologías que estudian el proteoma. En otras palabras, la proteómica es el estudio de los sistemas multiproteicos cuyo enfoque se basa en el estudio de la interacción de distintas proteínas y el papel que juegan como parte de un sistema llámese una línea celular, un tejido o un organismo completo [5,7]. El proteoma es un elemento altamente dinámico cuyos componentes varían, en un organismo, tejido, célula o compartimiento subcelular determinados, como consecuencia de cambios en su entorno, situaciones de estrés, administración de drogas, efectores o señales bioquímicas o en cierto estado fisiológico o patológico. Estos factores incrementan de forma considerable la complejidad del proteoma, como consecuencia de la activación o supresión de la expresión de genes, las alteraciones en la intrincada pauta de interacciones intracelulares entre las proteínas o los cambios en sus modificaciones postraduccionales.

Si bien la bioquímica de proteínas y la proteómica llevan a cabo la identificación de proteínas, la diferencia substancial entre ellas es que la proteómica tiene como objetivo la

caracterización de un sistema más que el comportamiento de un solo componente proteico (Figura 1). En México, si bien desde hace ya unos años se han desarrollado diversas investigaciones sobre el proteoma humano, aún es poca la información que se ha generado. Al respecto, es importante tener un mejor conocimiento de las técnicas sobre las que se fundamenta la investigación en Proteómica y los avances científicos y tecnológicos que han originado este desarrollo.

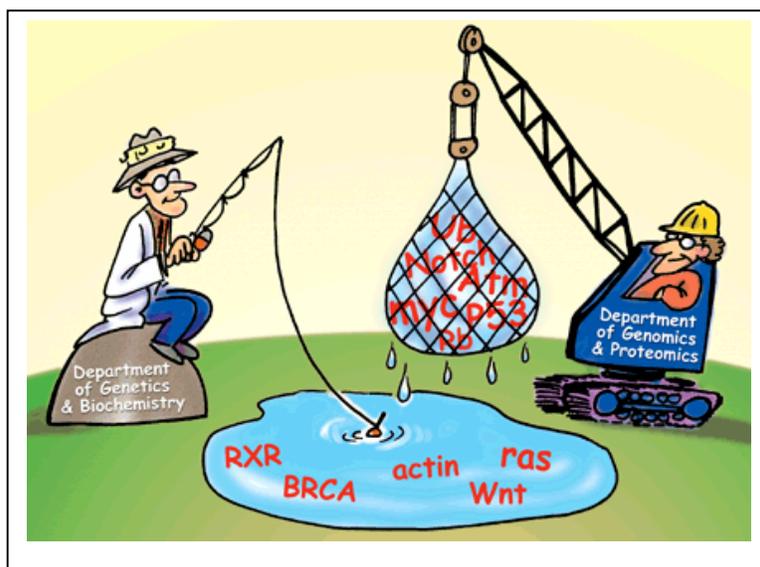


Figura 1. La Bioquímica, la genética y la proteómica (ilustración de Joe Sutliff en referencia [1]).

La proteómica es una de las nuevas tecnologías que más interés está despertando en la ciencia. Este auge actual de la proteómica se debe a dos razones fundamentales. Por un lado, los grandes proyectos de secuenciación de genomas han generado una enorme cantidad de información. La necesidad de descifrar esta información genómica ha estimulado considerablemente al estudio directo de las proteínas a gran escala. De forma paralela, se ha estimulado el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas para analizar y procesar esta enorme información. La aparición de herramientas que, por primera vez en la historia de las biociencias, permiten el análisis sistemático de las proteínas, ha permitido el desarrollo de la proteómica moderna. Algunos autores prefieren definir la Proteómica como la parte de la Genómica funcional que centra su atención en el estudio directo de las proteínas; sin embargo, este término no es adecuado ya que la genómica en sí abarca tecnologías que no utiliza la química.

La ciencia se mueve de la genómica a la proteómica a fin de obtener un conocimiento profundo de la red funcional de la expresión génica. Realmente la proteómica es más antigua que genómica. Los primeros estudios en proteómica comenzaron en 1975 con la introducción de los geles de dos dimensiones por diversos grupos que comenzaron a obtener mapas de proteínas de *Escherichia coli*, ratones y algunos tipos de conejillos. En ese tiempo cerca de 300 proteínas podían ser separadas pero debido a limitaciones técnicas no era posible identificarlas completamente. Actualmente, con metodologías y técnicas instrumentales más refinadas tanto la separación como la identificación de proteínas ha avanzado a pasos agigantados en condiciones reproducibles [8,9]. De forma reciente el concepto de *Biología de Sistemas* ha sido introducido en el estudio de los sistemas vivos. Desde este punto de vista la proteómica y la genómica son esenciales para el análisis de un sistema complejo (Figura 2).

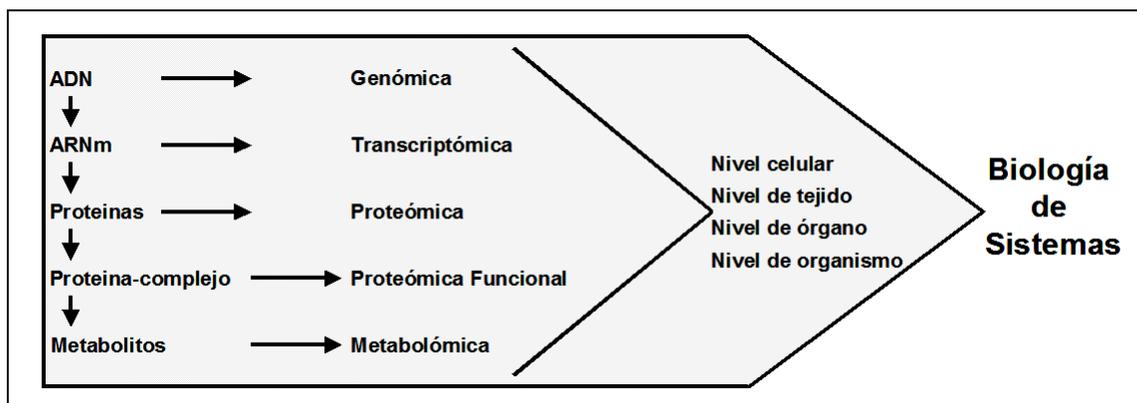


Figura 2. Biología de Sistemas (Adaptado de [10]).

Proteómica y biología

La acumulación de secuencias completas de genomas no es suficiente para elucidar la función biológica. A partir del estudio únicamente de genes no toda la información biológica puede ser obtenida. Por ejemplo, las proteínas son las responsables de los fenotipos celulares, no los genes. Así, es imposible elucidar los mecanismos que favorecen las enfermedades, el envejecimiento y analizar los efectos del medio ambiente estudiando únicamente el genoma. La importancia de la proteómica es el resultado directo de los avances hechos a gran escala de secuenciación de nucleótidos; sin embargo, la única forma de comprender las funciones biológicas de un sistema es a través del estudio de las proteínas [8,11].

Existen cuatro aplicaciones principales de la Proteómica [7]:

- 1) Minería de proteínas. El estudio implica la simple identificación de tantas proteínas como sea posible en una muestra.
- 2) Perfiles de expresión proteica. Se refiere a la identificación de una proteína en una muestra en un estado en particular de un organismo o célula. Por ejemplo, en alguna enfermedad o como resultado de una exposición a alguna droga, cambios en el medio ambiente o respuesta algún otro estímulo. Las células o tejidos "normales" pueden ser comparados con un estado fisiológico o patológico para determinar la expresión diferencial de proteínas en los distintos estadios.
- 3) Mapas de redes de proteínas. En esta aproximación, se determina como las proteínas interactúan entre ellas en organismos vivos.
- 4) Mapeo de modificaciones en proteínas. Consiste en identificar cómo y dónde son modificadas las proteínas. Las modificaciones postraduccionales generalmente gobiernan la estructura y la función de las proteínas por lo cual es importante conocer cómo una proteína ha sido modificada.

Así, en resumen, podemos decir que la proteómica incluye no sólo la identificación de proteínas sino también la determinación de su localización, modificaciones, interacciones, actividades y principalmente su función en última instancia. Una de las herramientas de mayor uso en los últimos años en esta área ha sido la Espectrometría de Masas (EM), que si bien es usada en muchos lugares como una herramienta para el análisis proteómico es poco entendida en realidad. Para analizar el papel que juega la Espectrometría de Masas en proteómica, debemos inicialmente de entender los principios básicos sobre los que descansa.

Bases de la espectrometría de masas aplicada en ciencias biológicas

La Espectrometría de Masas (EM) es una técnica analítica que tiene gran aplicación en diversas áreas del conocimiento. De forma general podemos decir que esta técnica permite determinar con cierto grado de exactitud la relación masa-carga (m/z) de los iones producidos a partir de los compuestos analizados en una muestra; en algunos casos también proporciona información estructural directa. El análisis por EM consta de los siguientes pasos: Introducción de Muestra; Ionización; Separación por m/z ; y Detección.

Un espectrómetro de masas está diseñado para llevar a cabo todas las tareas anteriores y actualmente existen varios modelos en el mercado. La Figura 3 muestra los componentes principales de un espectrómetro de masas y es posible observar que existen diversas opciones para el proceso de ionización de la muestra así como para la etapa de la separación por m/z . El análisis de cada una de las partes en particular, va más allá del alcance de este documento por lo que únicamente y de forma muy breve analizaremos lo que es más utilizado en Proteómica para la identificación de proteínas.

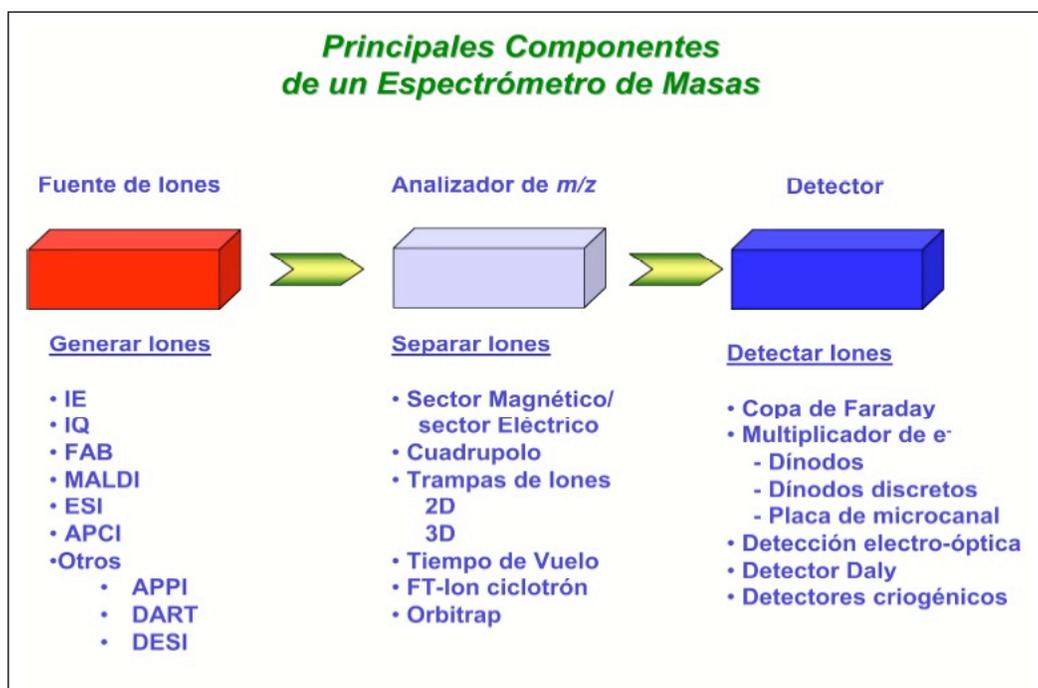


Figura 3. Componentes Básicos de un Espectrómetro de Masas. IE: Ionización electrónica; IQ: Ionización química; FAB: Bombardeo por Átomos Rápidos; ESI: Ionización por electrospray; MALDI: Ionización por desorción con láser asistida por matriz; APCI: Ionización química a presión atmosférica; APPI: Fotoionización a presión atmosférica; DART: Análisis directo en tiempo real; DESI: Ionización por desorción con electrospray; FT: Transformada de Fourier.

Métodos de ionización

Los dos métodos de ionización más utilizados en la actualidad que se aplican en proteómica son *MALDI* (del inglés Matrix-Assisted Laser/Desorption Ionization) y *ESI* (del inglés Electrospray Ionization). MALDI fue desarrollada por los investigadores alemanes F. Hillenkamp

y M. Karas a finales de 1980 y actualmente, ha llegado a ser una piedra angular en el análisis de biomoléculas [12-15].

Si bien el primer espectro de una proteína ionizada por láser fue mostrado por Tanaka lo que le valió un discutido premio Nobel en 2002 [16,17], el desarrollo de la metodología tal y como la conocemos ahora, se debió a los investigadores germanos [14,15]. MALDI usa la absorción de radiación láser de una muestra que se encuentra mezclada con una matriz, ambas en fase sólida. La matriz absorbe energía del láser y la transfiere a la muestra lo que provoca que se formen iones con un número de cargas que van aproximadamente de 1 a 5 dependiendo del tamaño del péptido o proteína analizada. Una variante tecnológica de MALDI que se ha utilizado de forma relativamente amplia para la búsqueda de biomarcadores es SELDI (del inglés Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization). En esta variación la placa sobre la cual se deposita la muestra es una superficie modificada químicamente donde se lleva a cabo la unión selectiva de las proteínas de acuerdo a los mecanismos de interacción superficie-proteína. Estos mecanismos son determinados por los grupos funcionales que recubren la superficie de la placa donde se realiza el análisis. Este sistema es análogo a lo que se conoce como extracción en fase sólida en los métodos cromatográficos [18]. El objetivo de esta metodología es purificar y separar las proteínas de su matriz (suero, plasma, orina, saliva, etc..) antes de su ionización mediante el láser.

Electrospray, introducida por Fenn y colaboradores en 1984 [19-21], es una técnica de ionización suave en la cual los iones que están en solución son colocados en fase gaseosa a través de un mecanismo de desorción o de evaporación. La muestra es rociada a través de una diferencia de potencial elevada (3-8 kvolts) entre una punta de diámetro pequeño y el orificio de entrada en la interfase que permite enviar los iones al analizador de m/z (Figura 4).

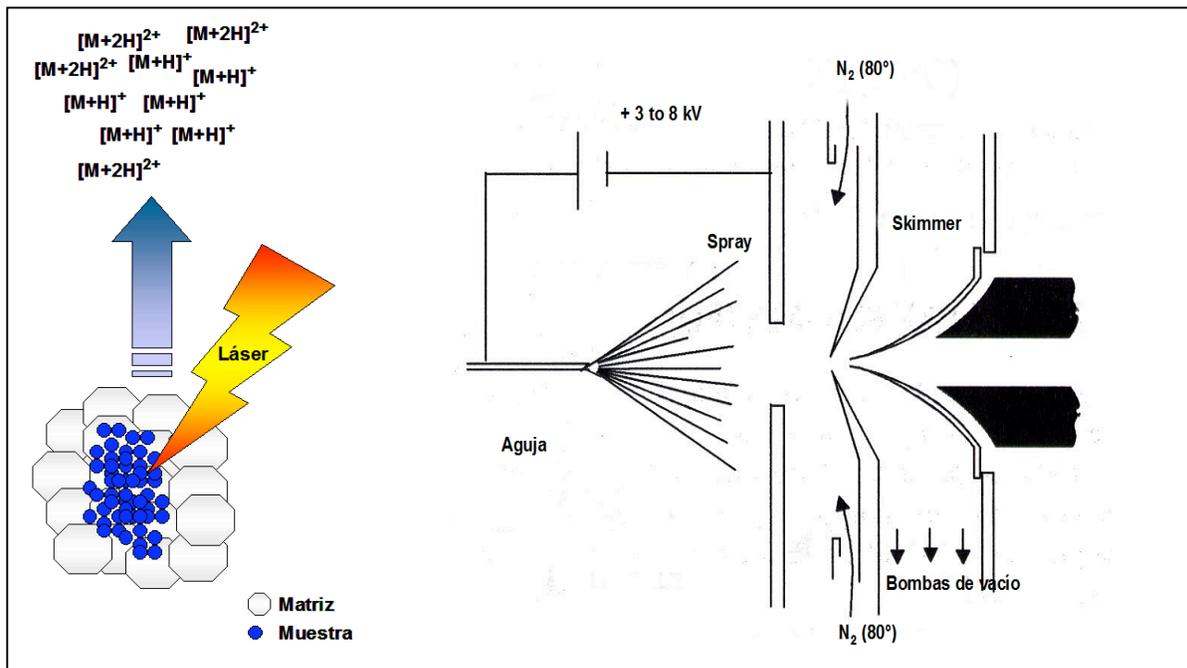


Figura 4. Procesos de Ionización por MALDI y ESI. En MALDI la muestra co-cristalizada con la matriz es ionizada mediante un láser (típicamente UV de 337 nm), en el caso de ESI el analito en solución pasa a través de un capilar de forma que el fluido es rociado en un campo eléctrico lo que genera gotas muy finas. La presencia de este campo eléctrico es esencial para obtener una buena nebulización y en muchos casos, para la ionización a través de un proceso electroquímico. (Figura de ESI modificada de [22]).

En ESI convencional se utilizan calor y gas (N_2) para desolvatar los iones que existen en las pequeñas gotas de la muestra en solución. En este caso las moléculas de proteína o péptido se encuentran multicargadas de acuerdo a su basicidad lo cual puede llegar a producir que proteínas intactas tales como la albúmina presenten una distribución de iones de entre 10 y 60 cargas. Actualmente, la versión de nanospray es la de mayor uso en Proteómica; debido a que los flujos son pequeños entre 75 y 300 nL/min no necesario el uso de N_2 .

Analizadores de m/z

La materia ionizada puede manipularse por medio de campos eléctricos y magnéticos. Por lo tanto, después de la fuente de ionización, los iones son sujetos a campos magnéticos y eléctricos a fin de separarlos. La aceleración, la energía y el *momentum* inducidos por campos magnéticos y eléctricos son dependientes de la carga del ión por lo cual los llamados analizadores de masa separan iones de acuerdo a su relación masa-carga (m/z) y no únicamente a su masa. En principio, todas las técnicas de ionización podrían acoplarse a cualquier analizador de m/z ; sin embargo, algunos acoplamientos trabajan mejor que otros debido a las características particulares de los propios analizadores, la técnica de ionización y el tipo de información que se está procesando. En general, los analizadores de m/z tienen algunas características en común como son: 1) el rango de masa (máximo m/z detectable); 2) el poder de resolución (capacidad para separar iones de m/z adyacente); 3) la exactitud en la medición de masa; 4) la transmisión iónica y su sensibilidad [23,24].

Si bien no vamos a abordar cada uno de los analizadores de m/z que existen, mencionaremos que los más comunes utilizadas en proteómica son: trampas iónicas (3D y lineales), tiempos de vuelo (TOF del inglés Time Of Flight), cuadrupolos, ion-ciclotrón transformada de Fourier (FT-ICR-MS) y Orbitrap. Todos estos analizadores tienen sus propias características y pueden ser utilizados en diferentes combinaciones que permiten diversos tipos de análisis en el área de proteómica.

Generalmente la característica principal de los equipos utilizados en proteómica es que pueden llevar a cabo experimentos de masas/masas los cuales serán explicados más adelante. Estos sistemas híbridos constan de dos analizadores de m/z conectados en serie con la fuente de ionización y el detector. Debido a estos acoplamientos es posible obtener información de la estructura de péptidos y de proteínas, ya que entre los dos analizadores se coloca una celda de colisión donde se fragmentan iones provenientes de la muestra. En el caso de las trampas de iones estas actúan como analizadores de m/z y como celdas de colisión al mismo tiempo. A manera de ejemplo se presenta en la Figura 5 la representación de uno de los equipos híbridos más populares en los últimos años en el área de proteómica, en este arreglo se tiene una trampa lineal acoplada a un Orbitrap.

Finalmente es necesario comentar que en el mercado se ha incorporado de forma relativamente reciente un acoplamiento Espectrometría de Masas/Espectrometría de Movilidad Iónica donde es posible aislar y analizar iones isobáricos. Esto ha llevado a la posibilidad de analizar cambios conformacionales de algunas proteínas ionizadas como por ejemplo el citocromo c [4].

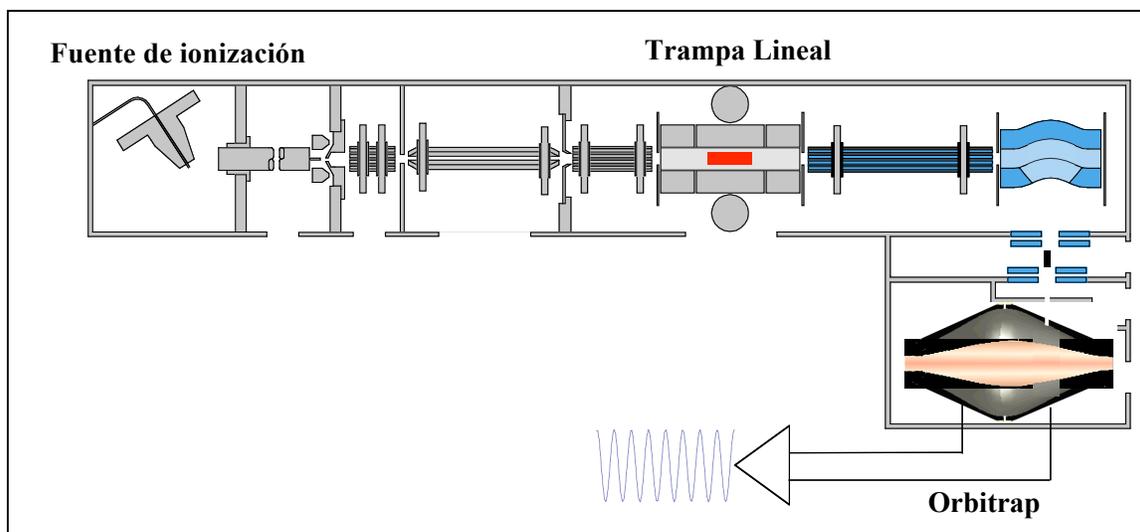


Figura 5. Representación esquemática de un equipo híbrido de Espectrometría de Masas. Consiste en una fuente de ionización que puede ser electrospray o MALDI y dos analizadores de m/z conectados en serie, una trampa lineal y un orbitrap. En la Trampa es posible llevar a cabo experimentos de masas/masas y el Orbitrap es capaz de realizar mediciones muy exactas (menores a 5 ppm). (Imagen cortesía Thermo Scientific).

Identificación de proteínas utilizando espectrometría de masas

A diferencia de la espectrometría de masas clásica basada en la ionización electrónica donde un patrón de fragmentación proporcionaba información estructural, en la espectrometría de masas moderna, las ionizaciones son suaves lo que deja prácticamente intactas a péptidos y proteínas analizadas. Por lo tanto, si en una muestra se analizara únicamente la mezcla de péptidos, obtendríamos de forma indirecta, los pesos moleculares (PMs) de estos péptidos con una cierta exactitud de acuerdo a las características del espectrómetro de masas. A manera de ejemplo supongamos que en el análisis de un péptido, se determinó que su PM era de 1296.0 Da con una exactitud de ± 0.1 Da, podemos fácilmente imaginar que existen varias combinaciones de los 20 aminoácidos esenciales que pueden encajar perfectamente en el valor determinado experimentalmente (1295.9 – 1296.1 Da). Si esto lo extrapolamos al nivel de una proteína, las posibilidades de conocer su secuencia únicamente por medio de la determinación de PM, a través de la Espectrometría de Masas, es prácticamente imposible en nuestros días.

Una poderosa herramienta que se utiliza en EM son los denominados experimentos de masas/masas (EM/EM) donde a través de equipos híbridos (Figura), los iones detectados por medio de un primer analizador de m/z son secuencialmente fragmentados en una celda de colisión (experimento CID, del inglés Collision-Induced Dissociation). Estos iones fragmento son detectados por un segundo analizador de m/z . Por lo tanto, para cada ion precursor fragmentado tenemos una especie de huella digital que depende directamente de su estructura y en el caso de péptidos de su secuencia de aminoácidos.

A partir de lo anterior, las estrategias que se han adoptado para la identificación de proteínas por medio de EM son:

- a) Estrategia de abajo hacia arriba (Bottom-Up)
- b) Estrategia de arriba hacia abajo (Top-Down)

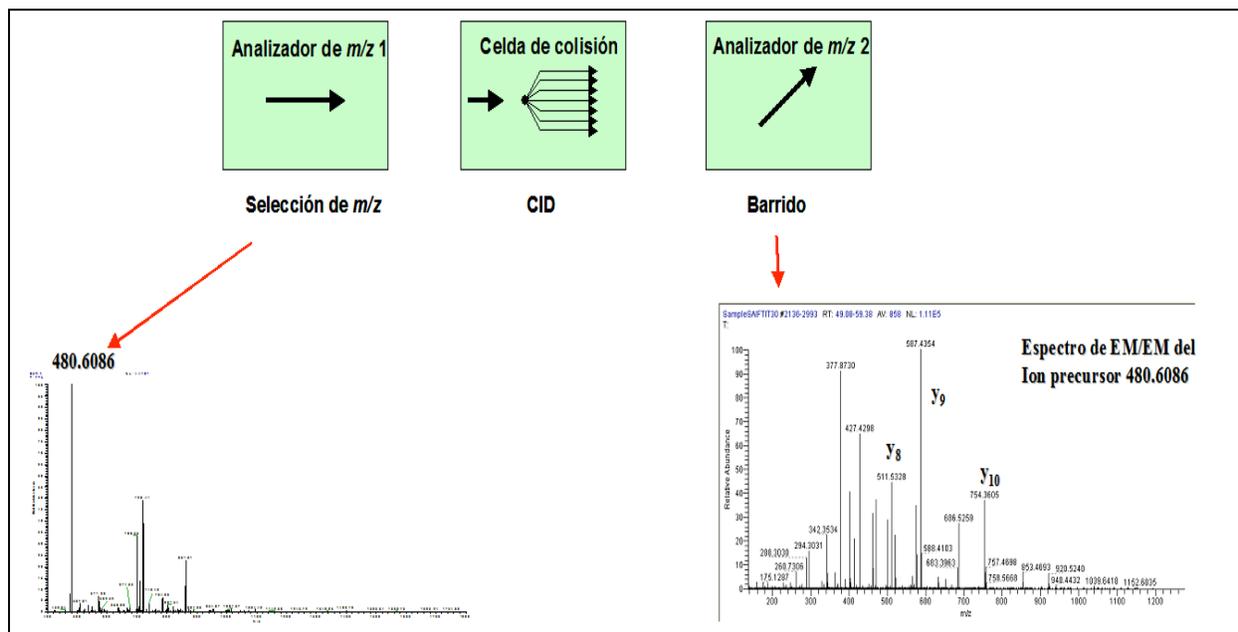


Figura 6. Concepto de un experimento de masas/masas aplicado a un péptido de m/z 480.60.

En la primera aproximación (bottom-up), una mezcla de proteínas se digiere mediante una reacción química o enzimática. Los péptidos obtenidos del producto de la digestión son inyectados a un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC del inglés High Performance Liquid Chromatography) acoplado a un sistema de Espectrometría de Masas donde los fragmentos proteicos son separados y ionizados. De esta forma, es posible determinar los PMs de los péptidos provenientes de la digestión. El mismo experimento se lleva a cabo *in silico* con todas las proteínas reportadas en una base de datos. Así, a través de algoritmos bioinformáticos se correlacionan los valores teóricos de m/z de las secuencias de los péptidos producidos en la digestión *in silico*, con los valores determinados de forma experimental. Cuando ambos valores coinciden dentro de un cierto margen de error entonces se puede establecer que la secuencia peptídica proveniente de la base de datos es la que corresponde al valor de m/z que se determinó experimentalmente. Y por ende, a partir de las secuencias de péptidos determinadas es posible conocer las proteínas de donde provienen lo que al final del experimento nos lleva a una lista de posibles proteínas presentes en la muestra con un cierto error experimental asociado. A este procedimiento se le conoce como Mapeo de Huella Peptídica (peptide mass fingerprinting). Como se puede observar, la determinación de las proteínas presentes en la muestra depende en última instancia de la exactitud de los valores de m/z obtenidos experimentalmente para cada péptido ionizado. Por lo tanto la posibilidad de falsos positivos siguiendo esta metodología puede ser importante.

A fin de dar mayor certidumbre a estos resultados se agrega un segundo paso utilizando experimentos EM/EM. Así, para cada péptido ionizado se determina su valor de m/z experimental y además se envía a una celda de colisión donde se obtiene un patrón de fragmentación para el péptido ionizado en cuestión (experimento EM/EM). De esta forma estos valores experimentales se comparan con los valores teóricos obtenidos del experimento *in silico*, con el fin de determinar la secuencia de los péptidos ionizados. Dado que los patrones de fragmentación son como la huella digital para cada péptido, la identificación de las secuencias peptídicas son altamente confiables y como consecuencia de esto la identificación de las

proteínas presentes en la muestra también lo son, con un bajo número de falsos positivos (Figura 7).

Para el manejo de los datos provenientes de los experimentos de EM y la comparación de los resultados experimentales con los teóricos así como la asignación de péptidos y proteínas existen diferentes algoritmos matemáticos desarrollados, entre ellos los más conocidos son Paragon, MASCOT, SEQUEST y xTANDEM entre otros [5,25,26].

Es necesario hacer notar que una vez digeridas las proteínas, se generan una gran cantidad de péptidos por lo que es esencial la separación de estos productos de digestión utilizando métodos cromatográficos, electroforéticos, etc. Idealmente, cada péptido individual debería de ser analizado, sin embargo en la actualidad, no es posible llevarlo a cabo experimentalmente de forma completa. Varias estrategias se han diseñado para resolver este problema; entre la más conocida está la aplicación de una cromatografía bidimensional que utiliza dos mecanismos de separación (generalmente intercambio iónico e hidrofobicidad en una fase reversa). Esta aproximación se le conoce como MUDPIT (del inglés MUltiDimensional Protein Identification Technology) y principalmente se aplica a muestras de proteínas altamente complejas provenientes de extractos celulares totales.

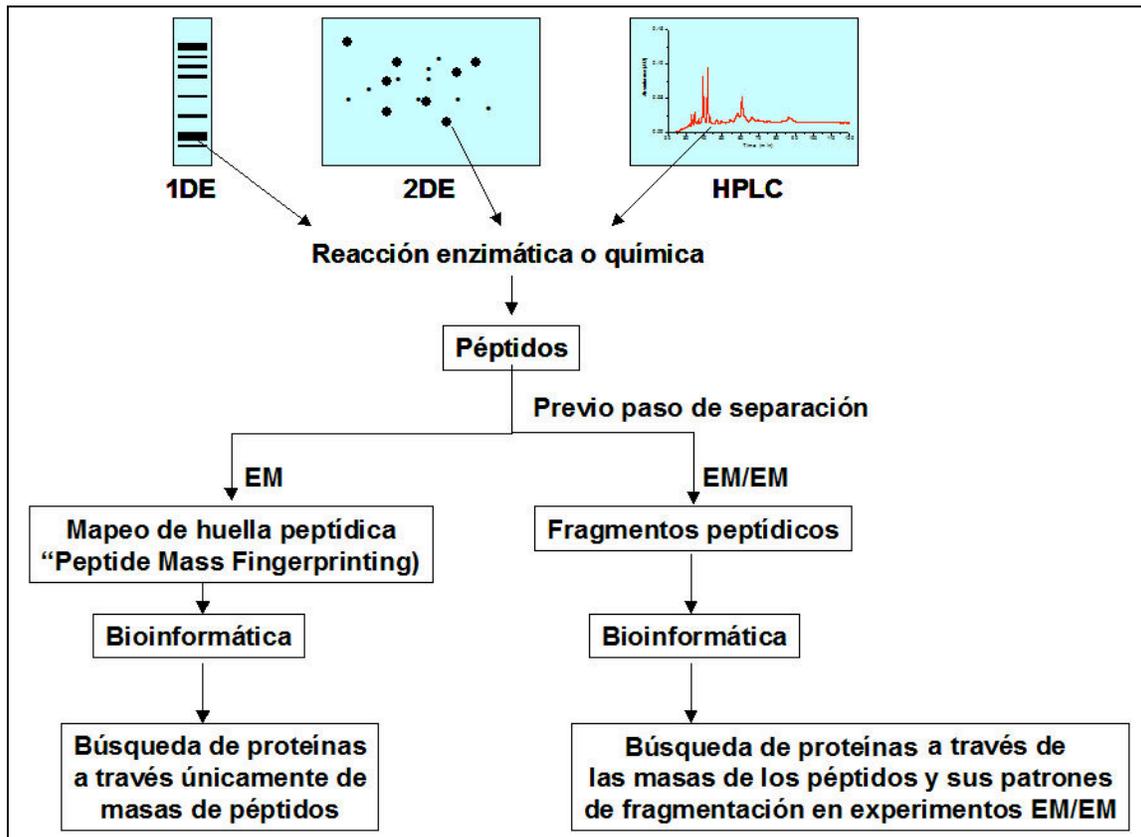


Figura 7. Esquema que muestra la identificación de proteínas a partir de datos de Espectrometría de Masas.

En la segunda aproximación llamada “de arriba hacia abajo”, la proteína intacta es separada y analizada individualmente. Para cada proteína se llevan a cabo experimentos secuenciales de EM/EM, a fin de ir elucidando poco a poco la secuencia de la proteína. Estos experimentos se realizan con equipos denominados de alta resolución tales como los que llevan al Orbitrap o al FTICR en sus arreglos instrumentales (por ejemplo una trampa acoplada al FTICR), dado que su exactitud de masa en estos instrumentos es alta, de menos de 5 ppm en un rango de m/z hasta de 4000. Esta exactitud es necesaria a fin de reducir las posibilidades de la secuencia probable de aminoácidos.

La Espectrometría de masas y la proteómica en la búsqueda de biomarcadores

La proteómica como se definió anteriormente, es el estudio sistemático de las proteínas presentes en una muestra específica, y de forma más general se puede decir que es el análisis científico de todas las proteínas expresadas por un genoma. Una rama de la proteómica es la llamada actualmente Proteómica Médica cuyo objetivo principal es el descubrimiento de biomarcadores de diagnóstico y de pronóstico, así como marcadores terapéuticos. Este propósito ha permitido identificar a las proteínas involucradas en procesos patológicos con el fin de entender cómo los cambios en ellas causan alguna enfermedad. [27].

Se puede definir un biomarcador como una característica que es objetivamente medible y evaluada; como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden tener invaluable aplicaciones en la detección temprana de una enfermedad y en el monitoreo del estado de salud en una persona. Así por ejemplo en cáncer, se ha pensado que los mejores biomarcadores podrían venir de proteínas o fragmentos de células cancerosas secretadas al torrente sanguíneo.

Los métodos para identificar biomarcadores clínicos se pueden dividir en dos categorías de acuerdo a las metodologías empleadas: métodos basados en espectrometría de masas y métodos basados en arreglos de anticuerpos (Figura 8).

En el área de proteómica médica o clínica, la espectrometría de masas ha permitido el descubrimiento de biomarcadores de diagnóstico y la creación de imágenes de un tejido, respectivamente. Se piensa que conforme la sangre pasa a través de un órgano enfermo, el perfil de proteínas cambia debido a la alteración en el órgano. Por tanto, las proteínas pueden estar modificadas, mutadas o cambiar sus niveles de expresión (sobre-expresadas o sub-expresadas). Como consecuencia, el perfil proteico en fluidos biológicos podría ser diferente entre estados normales y patológicos, lo que permitiría una gran oportunidad de análisis en suero, plasma, orina, saliva, líquido seminal, líquido cefalorraquídeo, etc. En el caso de la búsqueda de biomarcadores se pueden seguir diferentes aproximaciones; en la forma más común se trata de identificar proteínas que son diferencialmente expresadas. Estas proteínas deben de ser identificadas y cuantificadas ya sea de forma relativa o absoluta. En la forma más clásica, las proteínas extraídas de la muestra son separadas por medio de electroforesis en gel en una primera dimensión según su punto isoeléctrico (“isoelectroenfoque”), y posteriormente, de forma ortogonal en una segunda dimensión en función de su masa.

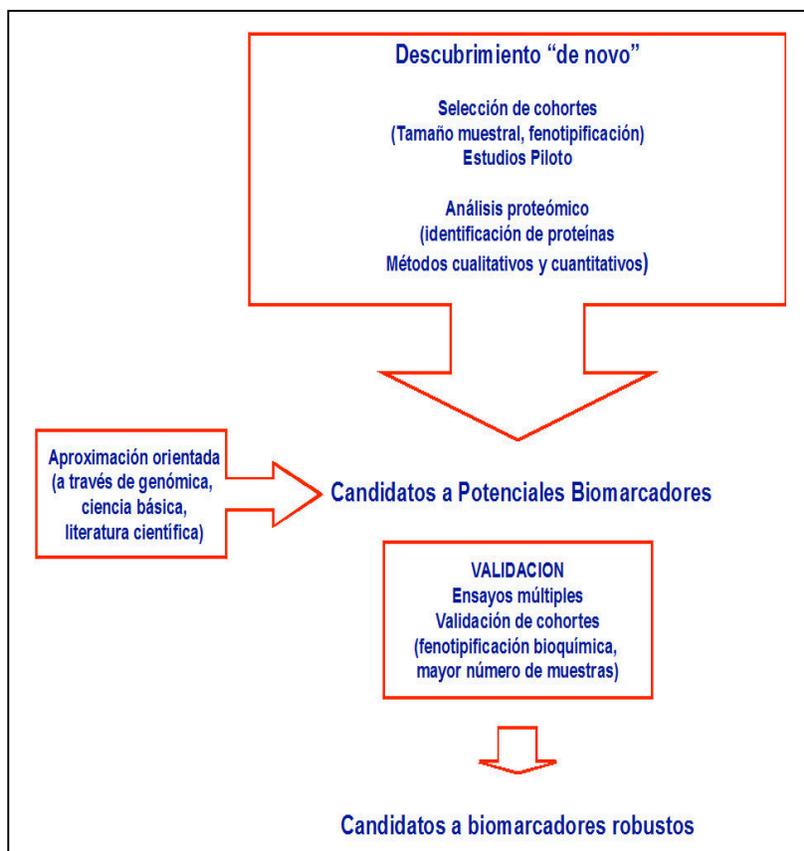


Figura 8. Esquema simplificado de la búsqueda de biomarcadores. Esta búsqueda puede basarse en 1) los datos genómicos o de la literatura de donde se determina cuál proteína puede ser un posible biomarcador 2) a través del análisis proteómico directo a partir de muestras donde se extraen proteínas buscando aquellas que se expresan diferencialmente en diferentes grupos de muestras (adaptado de [28]).

Con la electroforesis bidimensional se pueden separar varios miles de proteínas en un solo gel [2]. Esta técnica se realiza en presencia de SDS (dodecil-sulfato sódico), también conocida como SDS-PAGE (del inglés SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). La separación de proteínas según sus propiedades eléctricas y su tamaño se le conoce como “electroforesis bidimensional” o “electroforesis-2D” o 2-DE. El resultado es una serie de puntos o “spots”, cada uno de los cuales corresponde idealmente a una proteína. Las proteínas diferencialmente expresadas son finalmente identificadas por EM. Dado que algunas proteínas pueden perderse en el camino de la separación electroforética, en la búsqueda de biomarcadores se está utilizando lo que se denomina la estrategia “shotgun proteomics” donde las proteínas extraídas de muestras de tejidos o fluidos biológicos se digieren inmediatamente evitando el paso de separación de las proteínas intactas pero con una separación por medio de MUDPIT de los péptidos generados en la digestión (Figura 9) [5,25,26].

Tanto en la aproximación 2DE como en “shotgun proteomics” se busca la presencia o ausencia de proteínas o incluso péptidos que puedan constituir un biomarcador. En un primer momento las proteínas expresadas diferencialmente pueden ser catalogadas como potenciales biomarcadores. Sin embargo, es necesario llevar a cabo pasos de validación y confirmación, generalmente por medio de metodologías inmunológicas tales como Western-Blot, ELISA, etc. Para el análisis cuantitativo de posibles biomarcadores se utilizan también metodologías basadas en EM tales como MCAT, ICAT, ITRAQ, AQUA, entre otras. Para ICAT por ejemplo

[29], las proteínas de una célula en el estado I son marcadas con un reactivo específico para cisteínas; las proteínas de las mismas células pero en un estado II son marcadas con el mismo reactivo pero deuterado. Una vez combinadas y proteolizadas los péptidos son aislados por medio de cromatografía de afinidad que únicamente seleccionan a los péptidos marcados. Estos péptidos, se introducen en un sistema de HPLC-EM/EM donde los péptidos que tienen la misma secuencia en ambos estados coeluyen cromatográficamente, pero en el espectro de EM muestran una diferencia entre si que está de acuerdo a la diferencia en D_a existente entre las especies que sirvieron para marcar. Si las proteínas donde provienen los péptidos no tienen diferencia cuantitativa en ambos estados, las señales deuteradas y sin deuterar serán similares; en caso contrario, mostrarán una diferencia significativa lo que llevará a concluir que la o las proteínas observadas se ven afectadas en los estadios estudiados y por tanto, pueden ser consideradas como potenciales biomarcadores [30].

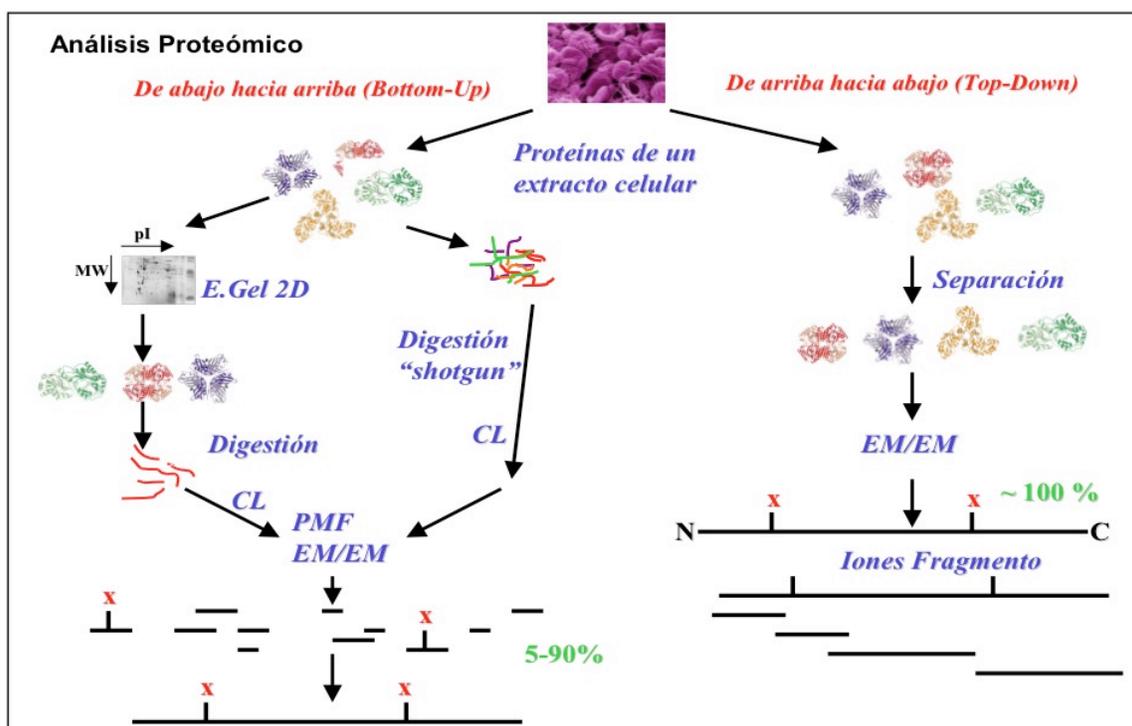


Figura 9. Análisis proteómico basada en Experimentación con Espectrometría de Masas (EM), CL= Cromatografía de líquidos, PMF = Mapeo de Huella Peptídica; (modificada de presentación de Thermo).

Algo relativamente nuevo en el campo de la búsqueda de biomarcadores asociados a experimentos de EM es el concepto de imagen por MALDI-EM. Esta técnica fue introducida por Caprioli y colaboradores, en 1997. En este caso la espectrometría de masas se utiliza para crear un mapa de péptidos y proteínas directamente de delgadas secciones de tejido (entre 10-12 mm), lo que permite la visualización de la distribución de patrones de proteínas, péptidos, e incluso fármacos y/o metabolitos tanto en tejidos sanos como con alguna enfermedad. Esta técnica puede ser aplicada desde la investigación básica con modelos animales que se utilizan muy frecuentemente (p. ej. rata, pez cebra, etc...) (Figura 10).

Si bien el hallazgo de biomarcadores se ha cimentado en las aproximaciones antes descritas, desafortunadamente y pesar de su alto potencial diagnóstico, pocas proteínas son utilizadas en la clínica. Esta limitante se debe en parte, por las grandes dificultades de su uso tanto en el ámbito tecnológico como por la poca capacidad que aun existe de los análisis de proteomas. En forma global es posible usar biomarcadores en distintos ámbitos biológicos, donde las diferencias genéticas entre la población y el factor ambiental permiten identificar diferencias entre la gente de distintas en regiones en planeta [29].

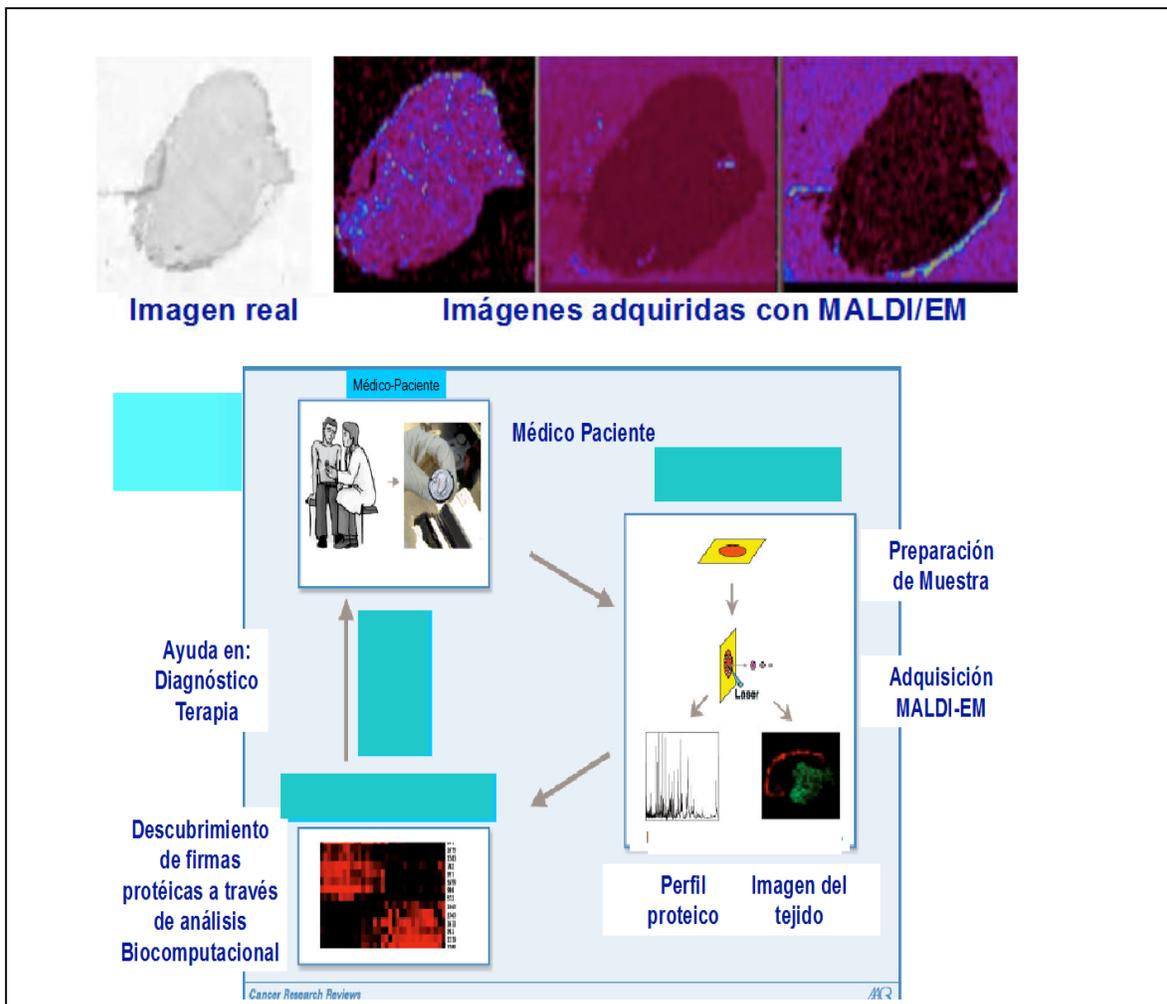


Figura 10. Imagen por MALDI-EM. Arriba: Imágenes de cerebro de rata (KGC Calderón-JL Gallegos, INMEGEN, México). Abajo: Conceptualización de la aplicación de obtención de imágenes por MALDI/EM en la clínica, tomado de referencia [31].

Si bien el hallazgo de biomarcadores se ha cimentado en las aproximaciones antes descritas, desafortunadamente y pesar de su alto potencial diagnóstico, pocas proteínas son utilizadas en la clínica. Esto es debido a que por una parte se han tenido grandes dificultades tanto en el ámbito tecnológico, con la poca capacidad que aun existe de análisis de proteomas en forma global, como en el ámbito biológico, donde las diferencias genéticas y el factor ambiental hacen que existan distintos proteomas entre pacientes de diferentes regiones del planeta [29]. Así, la clave para la exitosa aplicación de métodos de espectrometría de masas

para el descubrimiento de biomarcadores recae en lograr un estándar de referencia para el proteoma humano y un mejor entendimiento de las fuentes y el grado de la variabilidad “normal” de éste [32].

Perspectivas

Debemos de tomar el futuro en el descubrimiento de nuevos biomarcadores con entusiasmo y precaución. El entusiasmo debe ser en parte a la posibilidad del uso de nuevas tecnologías y ensayos, y la precaución en cuanto a la posibilidad de fallas en el análisis e interpretación [32].

La contribución de la Espectrometría de Masas a través de la Proteómica es la búsqueda de biomarcadores. Si bien aún es temprano realizar una evaluación global de los resultados obtenidos por Espectrometría de Masas, es posible pensar que conforme pase el tiempo, el impacto de esta herramienta continuará creciendo y proporcionará expectativas y realidades en el descubrimiento de nuevos biomarcadores lo que en un futuro próximo, se desarrollarán formas novedosas de diagnóstico y el monitoreo temprano de enfermedades. Sin embargo debemos de tener presente que aún con el uso de instrumentación analítica de vanguardia, nada puede reemplazar una planeación cuidadosa del estudio así como una adecuada recolección y almacenamiento de muestras [34].

Referencias

1. Fields, S. (2001) *Science* 291(5507), 1221-1224
2. John, B. O. (2008) *Revista Colombiana de cardiología*. Enero/Febrero Vol. 5(1)
3. Sparkman O., D. (2006) *Mass Spectrometry Desk Reference*, 2nd Ed., Global View Publishing, Pittsburgh, PA.
4. Watson, J. T., and Sparkman O., D. (2007) *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*, 4th. edition Ed., John Wiley & Sons Inc, USA
5. Liebler, D. C., and Editor. (2002) *Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology*, Humana Press, Totowa, NJ.
6. Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., and Williams, K. L. (1996) *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19-50
7. Andersen, J. S., and Mann, M. (2000) *FEBS Lett.* 480(1), 25-31
8. Graves, P. R., and Haystead, T. A. (2002) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(1), 39-63;
9. Sperling, K. (2001) *Electrophoresis* 22(14), 2835-2837
10. Wang, M., Lamers, R. J., Korthout, H. A., van Nesselrooij, J. H., Witkamp, R. F., van der Heijden, R., Voshol, P. J., Havekes, L. M., Verpoorte, R., and van der Greef, J. (2005) *Phytother. Res.* 19(3), 173-182
11. Pandey, A., and Mann, M. (2000) *Nature* 405(6788), 837-846
12. Hillenkamp, F., Bahr, U., Karas, M., and Spengler, B. (1987) *Scanning Microscopy, Supplement 1(Phys. Aspects Microsc. Charact. Mater.)*, 33-39
13. Holm, R., Karas, M., and Vogt, H. (1987) *Anal. Chem.* 59(2), 371-373
14. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F. (1987) *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 78, 53-68
15. Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988) *Anal. Chem.* 60(20), 2299-2301
16. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., and Yohida, T. (1988) *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2(8), 151-153
17. Tanaka, K. (2003) *Angew Chem Int Ed Engl* 42(33), 3860-3870
18. Merchant, M., and Weinberger, S. R. (2000) *Electrophoresis* 21(6), 1164-1177
19. Yamashita, M., and Fenn, J. B. (1984) *J. Phys. Chem.* 88(20), 4451-4459
20. Yamashita, M., and Fenn, J. B. (1984) *J. Phys. Chem.* 88(20), 4671-4675
21. Yamashita, M., and Fenn, J. B. (1984) *Koenchu-Iyo Masu Kenkyukai* 9, 203-206
22. Hoffmann, E. d., Charette, J. J., and Stroobant, V. (1999) *Spectrométrie de masse*, Dunod Ed., Paris
23. Jennings, K. R., and Dolnikowski, G. G. (1990) *Methods Enzymol.* 193(Mass Spectrom.), 37-61

24. Carr, A. S., and Annan, S. R. (1997) Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry, John Wiley @ Sons, Inc.
25. Liebler, D. C., and Editor. (2005) Proteomics in Cancer Research, Wiley-Liss, USA
26. van der Greef, J., Stroobant, P., and van der Heijden, R. (2004) Curr. Opin. Chem. Biol. 8(5), 559-565
27. Dominguez, D. C., Lopes, R., and Torres, M. L. (2007) Clin Lab Sci 20(4), 234-238
28. Matt, P., Fu, Z., Fu, Q., and Van Eyk, J. E. (2008) Physiol Genomics 33(1), 12-17
29. Cagney, G., and Emili, A. (2002) Nat. Biotechnol. 20(2), 163-170
30. Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., and Aebersold, R. (1999) Nat. Biotechnol. 17(10), 994-999
31. Caprioli, R. M. (2005) Cancer Res 65(23), 10642-10645
32. Rodland, K. D. (2004) Dis Markers 20(3), 129-130
33. Whiteaker, J. R., Zhang, H., Zhao, L., Wang, P., Kelly-Spratt, K. S., Ivey, R. G., Piening, B. D., Feng, L. C., Kasarda, E., Gurley, K. E., Eng, J. K., Chodosh, L. A., Kemp, C. J., McIntosh, M. W., and Paulovich, A. G. (2007) J Proteome Res 6(10), 3962-3975
34. Ghosh, D., and Poisson, L. M. (2009) Genomics 93(1), 13-16

Semblanza del Dr. José Luis Gallegos Pérez



El Dr. José Luis Gallegos Pérez se graduó a nivel licenciatura como Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ). Realizó la Maestría en Química Analítica en la UNAM y el Doctorado en Química Analítica con Especialidad en Espectrometría de Masas en la Michigan State University, USA; bajo la supervisión del Prof. Dr. Jack Throck Watson. En su trayectoria profesional trabajó en el Departamento de la Ingeniería de la Calidad en Polaroid de México, S.A. de C. V.; en el Centro de Control Total de Calidades del Bajío, S.A. de C. V.; como profesor de Química en la Facultad de Química de la UAQ; y en el Laboratorio de

Espectrometría de Masas de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación en la UNAM. Desde 2006 forma parte del grupo de investigadores asociados del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Unidad de Proteómica Médica. Actualmente, el Dr. Gallegos participa como profesor invitado en cursos de posgrado en la maestría en Ciencias Ambientales y en la Especialidad en Instrumentación Analítica de la Facultad de Química de la UAQ, y en los programas de posgrado de las Facultades de Química de la UNAM y de la Universidad Autónoma del Estado de México. Así mismo, colabora en docencia dentro del INMEGEN impartiendo tópicos selectos en los cursos que ahí se imparten. También ha participado como docente en cursos organizados por el CINVESTAV y la Facultad de Medicina de la UNAM. Ha realizado diversas presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales como el de la Sociedad Química de México, de la Asociación Mexicana de Química Analítica, y en el de la Sociedad Americana de Espectrometría de Masas. El Dr. Gallegos es miembro de la Asociación Mexicana de Química Analítica, de la Sociedad de Proteómica Mexicana y de la Sociedad Americana de Espectrometría de Masas. Las áreas de investigación de su interés son el desarrollo y uso de nuevos métodos analíticos de separación y espectrometría de masas en diversas áreas tales como Proteómica, Metabólica, Química Analítica, Productos Naturales y Ciencias Ambientales.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

FISIOPATOLOGÍA Y TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS CUTÁNEA

Edgar Kröttsch

Laboratorio de Tejido Conjuntivo, Instituto Nacional de Rehabilitación.
Calzada México-Xochimilco 289, Colonia Arenal de Guadalupe. México D.F. 14389.
kroted@yahoo.com.mx

Resumen

Debido a que la piel es un órgano que tiene contacto íntimo con el medio ambiente, frecuentemente se encuentra en condiciones adversas que alteran su integridad, las quemaduras, en particular, así como patologías autoinmunes como la esclerodermia, frecuentemente dejan secuelas dramáticas en los individuos que las sufren, no sólo a nivel estético, sino a nivel funcional, ya que la fibrosis puede ocupar un volumen importante del tejido o puede estar en regiones de flexión que impidan la libre movilidad. Aún más, el fenómeno fibrosante puede combinarse con la contractura de la región y con ello se alteran significativamente las estructuras cutáneas, musculares e incluso óseas. Los mecanismos que llevan a la fibrosis cutánea involucran a una gran cantidad de factores celulares y humorales que se interrelacionan de manera cualitativa y cuantitativa, además de espacio-temporal, por lo que el estudio de su fisiopatología se vuelve clave para la búsqueda de terapias funcionales y seguras. Algunas de estas terapias están enfocadas en resolver el problema, pero sus resultados son pobres debido al daño ya producido, por lo que es deseable tratar de regular los mecanismos generadores de la patología cuando ésta aún no se encuentra presente o apenas comienza. No obstante los esfuerzos que se han realizado y el número de grupos de investigación que se enfocan al problema, a la fecha aún no contamos con estrategias completamente eficientes o seguras que cumplan con este objetivo.

Palabras clave: Piel, fibrosis, terapias.

Abstract

Skin is an organ intimate related to the external environment, frequently skin is affected by adverse conditions. Physical damage of the skin, such as burns, as well as autoimmune pathologies (i.e. scleroderma) produce severe scars to whom suffer them; not only at esthetic level, also altering the function of other tissues, since fibrosis occupy important volumes in the tissue or it could be localized on regions related with flexion or movement. Even more, fibrosis sometimes is combined with contracture of the tissues, altering cutaneous, muscular or bone structures. Mechanisms that conduce to skin fibrosis involve a high variety of factors, cellular and humoral, all of them interrelating qualitative and quantitatively, besides in a space-temporary fashion. For that reason, the knowledge of fibrosis physiopathology becomes essential in the seeking for effective and safe therapies. Some of these therapies are focused to solve the pathology, although results are poor due to the severe damage in the area. Therefore it is necessary to modulate the mechanisms that impair wound repair and regulate fibrotic process since the early phases. Nevertheless the enormous efforts achieved by different groups, still there is not an appropriate therapeutic strategy to prevent or eliminate skin fibrosis.

Keywords: Skin, fibrosis, therapies.

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, tiene una serie de características que la hacen única, como el encontrarse dispuesta en la interfase organismo-medio ambiente, lo que la lleva a estar en contacto con el exterior, con todas las consecuencias que esto significa. También, la piel presenta una variedad de tejidos con células completamente diferenciadas como son los queratinocitos de la capa granular y de transición, así como los adipocitos en su región más profunda y algunas clonas de fibroblastos, en la dermis, que anteriormente eran llamados fibrocitos [1].

Que por cierto, ahora las células que llevan esa denominación son caracterizadas por expresar actividad fibroblástica (recambio de matriz extracelular, MEC), pero también actividad monocitoide; es decir, que simultáneamente se comportan con linaje inmunológico y/o expresan marcadores de superficie celular de este sistema [2-4].

Y si bien la piel en condiciones normales presenta un recambio balanceado y continuo de la MEC, cuando ocurre algún daño y éste se mantiene sin resolver, o si el individuo expresa alguna anomalía de carácter genético como la cicatriz queloide o enfermedad autoinmune como algunas patologías de la colágena (v.gr. escleroderma), entonces tanto la síntesis como la degradación de la matriz se ven alteradas y se sobreexpresan moléculas extracelulares de depósito con propiedades fibrosantes como las colágenas tipos I y III, la fibronectina, etc. Y para ello, se requiere de una cascada intensa de señales humorales y celulares responsables de la activación de células mesenquimatosas quienes no sólo participarán en el depósito de la matriz, sino que también emitirán señales solubles que participarán de manera autócrina, parácrina e incluso endócrina en el proceso [5,6].

La fibrosis comienza con la activación local (en este caso cutánea) de diferentes sistemas. Esto es la activación de los vasos sanguíneos de la región por medio de la sobreexpresión de moléculas de adhesión celular como la E-selectina o también llamada molécula de adhesión de los leucocitos al endotelio, quien favorece el rodamiento de los leucocitos activados por la pared del vaso en la zona de gradiente de actividad inflamatoria; la molécula de adhesión celular vascular, junto con la molécula de adhesión intercelular, que son otro tipo de receptores que anclan a los leucocitos al endotelio y que permiten la diapedésis

(ELAM, VCAM e ICAM, respectivamente, por sus siglas en inglés). Con ello se consigue la activación en la dermis, que conlleva al reclutamiento de nuevos componentes leucocitarios y mesenquimatosos, bien sean de la región o a nivel sistémico, tanto diferenciados como pluripotenciales y quienes alcanzarán un grado de compromiso o de definición al entrar en contacto con el entorno matricial y humoral de la zona dañada, genéticamente diferente o activada [7,8].

Los fragmentos de matriz liberados durante la fase inflamatoria atraen células mononucleares de sangre periférica al sitio de la herida y/o secuela. Donde los macrófagos y las células locales activadas liberan factores angiogénicos como los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), los transformantes alfa y beta (TGF- α y TGF- β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la angiogenina, la angiotropina, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), así como la interleucina 8 (IL-8) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), además de otras sustancias de bajo peso molecular, como el péptido KGHK (-lisina-glicina-histidina-lisina-) derivado de la osteopontina o SPARC, aminos biógenas, ácido láctico y una tensión de oxígeno baja, generada por la hipoxia en el sitio del daño. Por su parte, la presencia de algunos de estos factores, básicamente el bFGF, estimulan en las células endoteliales la liberación del activador del plasminógeno y la procologenasa en fibroblastos y neutrófilos, lo que lleva a la conversión del plasminógeno en plasmina y a la procologenasa en colagenasa activa, cuyas actividades proteolíticas permiten la digestión de la membrana basal, así que se genera la proyección de pseudópodos a través de las membranas basales fragmentadas. Subsecuentemente, la célula endotelial migra al espacio perivascular por la presencia del mismo bFGF, los péptidos derivados de la fibronectina que se encuentran presentes en el área dañada y la heparina liberada por los mastocitos, además de otros factores quimioatrayentes de la célula endotelial. Sin embargo, para completar el proceso angiogénico, es necesario que la matriz perivascular presente un contenido importante de fibrina y fibronectina, ya que las células endoteliales migrantes expresan la integrina $\alpha v \beta 3$ que favorece su adhesión y migración. Posteriormente, la neovasculatura primero deposita su propia matriz provisional, rica en fibronectina y proteoglicanos, para finalmente formar una verdadera membrana basal. Donde el TGF- β estimula la síntesis de estos componentes e induce el fenotipo endotelial a las células para la formación de tubos capilares. Por su parte, el FGF y VEGF así como otros mitógenos, estimulan la proliferación celular, lo que conlleva a la extensión capilar. De esta manera, el proceso se prolonga durante los primeros días hasta que la neovasculatura se interconecta formando asas o plexos capilares a través de los cuales el flujo sanguíneo comenzará a circular [9].

Otro sistema, totalmente relacionado con la activación del sistema retículo-endotelial, es el de la respuesta humoral llevada a cabo por medio de citocinas y otros mediadores solubles como los derivados de los óxidos de nitrógeno (NO y NO₂), las prostaglandinas y los leucotrienos. En este contexto, estas moléculas que escasamente alcanzan los 30 KDa y que trabajan a concentraciones de nano y picomoles, guían la respuesta y la dimensión del gradiente de actividad para que las células que expresan receptores para ellas lleven a cabo funciones múltiples de manera simple o sinérgica, favoreciendo la activación de las células mesenquimatosas hacia el depósito de la matriz [10].

Para ello, es necesaria la participación de citocinas con actividades quimioatrayentes y mitogénicas entre otras, que se conocen como citocinas proinflamatorias. Dichas actividades, además de la modulación del fenotipo, dependen no sólo del tipo de citocina, sino de su concentración en el entorno, el nivel de actividad en la célula blanco y la MEC circundante. Cabe señalar, que ya en el plasma sanguíneo varias de estas citocinas se encuentran presentes de manera habitual; sin embargo, las plaquetas activadas, así como otros grupos de células linfoides, liberan cantidades importantes de ellas en el área dañada, que con la llegada de monocitos de sangre periférica y su activación a macrófagos [11] establecen las condiciones para la síntesis continua de estos factores y su liberación. Además que las células del parénquima, tanto las dañadas como las activadas, pueden sintetizar y secretar citocinas [10]

que junto con las ya presentes en la MEC normal [12] alcanzan niveles significativamente altos para activar, estimular y diferenciar a la variedad de células del tejido. De tal forma, que los macrófagos, fibroblastos y vasos sanguíneos se dispersan en el área dañada a través de una matriz temporal, que además de proveer soporte y guiar y activar células, permite la difusión de factores solubles como las mismas citocinas, hormonas, fragmentos proteicos, etc. Donde los macrófagos y neutrófilos [13], proveen una fuente continua de citocinas necesarias para estimular la fibroplasia; es decir, los fibroblastos construyen una nueva MEC que favorece a la infiltración celular y a los capilares que transportan el oxígeno y los nutrimentos requeridos para soportar todo el metabolismo tisular. Así que en el tejido de transición existe una reciprocidad dinámica entre los fibroblastos, las citocinas, la MEC y la neovascularización [10,14].

La fibroplasia, por su parte, consta de los componentes provenientes de los fibroblastos, donde cada uno de los componentes de la MEC se clasifica de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas y fisiológicas. De tal forma que existen proteínas fibrosas de dos tipos: las estructurales, principalmente como la colágena y la elastina, y las que participan en la adhesión como la misma colágena, la fibronectina, la laminina y la tenascina; ambas clases se encuentran en variedad de tamaños y formas, que se derivan de la expresión de diferentes genes y constituyen familias de proteínas.

Las variaciones en la composición, los niveles y la manera en como están organizadas estas macromoléculas dan lugar a una diversidad de formas, cada una adaptada a los requerimientos particulares de cada tejido. Así tenemos a las colágenas fibrilares del intersticio, que se componen por los tipos I y III principalmente, los cuales se asocian en forma de fibrillas junto con la colágena tipo V que regula el diámetro de las fibras. La concentración alta de la colágena tipo I presente en la mayoría de los tejidos, contribuye a la gran fuerza de tensión y a su resistencia a la deformación. La colágena tipo VI, esta organizada como filamentos finos que se intercalan con las fibrillas de colágena, y la distribución tan variada en que se presenta, sugiere que tenga un papel en la organización de otros de los componentes de la matriz [15], junto con la influencia del citoesqueleto de las células que la producen.

Las proteínas adhesivas participan en la interacción de las células con la MEC y con otras células, la fibronectina por ejemplo, promueve la interacción de los fibroblastos y otros tipos de células con la matriz del tejido conjuntivo, la laminina promueve la unión de las células epiteliales a la lámina basal, mientras que la tenascina puede regular la adhesión, dependiendo del tipo de receptores que presente la célula en un momento dado. Las moléculas de glicosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos, que son cadenas de GAG asociadas con núcleos proteicos en el tejido conjuntivo, forman una sustancia fundamental hidratada, tipo gel, en la cual se encuentran embebidas las proteínas fibrosas, de tal forma que este gel resiste las fuerzas compresivas en la matriz. También, la fase acuosa del gel de polisacáridos permite la difusión rápida de los nutrimentos, metabolitos, hormonas y otros factores solubles entre la sangre y las células de los tejidos, a lo que se denomina, la hidrodinamia. Por ejemplo, los fibroblastos fetales producen matrices pericelulares de ácido hialurónico, y éstas son significativamente más extensas que las producidas por fibroblastos post-natales, donde aparentemente la expresión del ácido hialurónico es una respuesta al factor estimulador de la migración (MSF) que no se observa en los cultivos de fibroblastos *neonatos* o adultos. Así que la mayor proporción del carbohidrato en tejidos fetales normales y de reparación, parece tener algún vínculo con la regeneración del tejido dañado, a diferencia de la reparación de menor calidad e incluso la fibrosis, observada en los tejidos *neonatos* lesionados o activados [16].

Así, podemos concluir para esta parte, que la regulación de los componentes de la MEC, se manifiesta como un proceso multifactorial, el cual solamente se altera durante los procesos de inflamación, tumorigénesis y reparación, dada la presencia de células activadas capaces de secretar citocinas en proporciones mayores a las basales o de expresar otras que no estaban presentes, además de la presencia de células efectoras residentes, generalmente mesenquimáticas, que modifican la síntesis de los componentes de la matriz y de las enzimas

encargadas de regular su recambio, que si bien, no son parte de la MEC misma, sí participan en la degradación de sus componentes. Por otro lado, se sabe que existen interacciones entre la matriz y algunas citocinas [6], lo que la hace un reservorio de factores multifuncionales, que conlleva a una regulación todavía más compleja, ya que cuando se presenta un daño en el tejido conjuntivo, se liberan, además de varias citocinas, péptidos biológicamente activos [17] que contienen dominios semejantes a los factores mismos, lo que induce su participación en esta intrincada red de estímulos positivos y negativos, teniendo tanta variedad de células blanco, como de receptores expresados en la superficie de las mismas.

Es de esta manera que el fenómeno de la fibroplasia es regulado por una gran variedad de factores, donde si bien se produce una gran cantidad de componentes de la MEC, principalmente colágenas, también se observa la incorporación de fibras de colágena residentes en la zona del daño y sus alrededores. Es decir, la matriz comprende fibras de neosíntesis además de las depositadas en la dermis antes del daño o la activación [18]. Para ello, los fibroblastos y miofibroblastos (que son un grado de diferenciación terminal de un grupo de células mesenquimatosas fibroblásticas) sintetizan y secretan diferentes moléculas de la MEC, lo anterior se lleva a cabo a través de su estimulación por queratinocitos, macrófagos, células endoteliales, fibrocitos, etc., por medio de la liberación de citocinas fibrogénicas.

Las causas para la formación de una secuela fibrosa o cicatriz patológica pueden ser varias; por ejemplo la extensión del daño es un factor que promueve la inflamación crónica [19]. Pero además si la lesión traumática cursa con hipoxia o infección o presencia de un cuerpo extraño o si se generó en contra de las líneas de tensión de la piel, entonces se presenta una dehiscencia y el daño tendrá que cerrar de segunda intención lo que también promueve la inflamación crónica y conduce a la patología conocida como cicatriz hipertrófica. Más aún, si el paciente presenta cierta predisposición a exacerbar el depósito de matriz, también se deriva una patología similar a la anterior conocida como cicatrización queloide, donde la diferencia con la cicatriz hipertrófica reside en algunas sus características morfológicas, bioquímicas y genéticas [20-23].

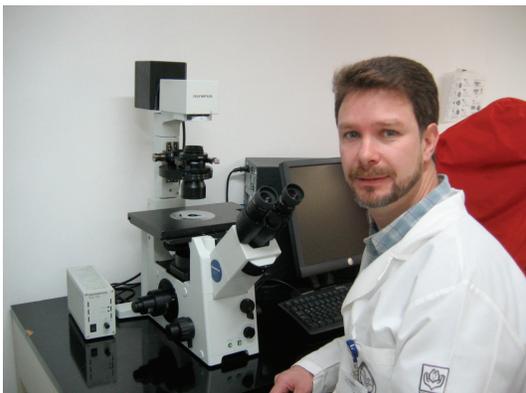
Lo anterior ha llevado desde hace tiempo a enfocar parte de la investigación en salud en el mejoramiento de los procesos de reparación, evitar la formación de secuelas fibrosas y la resolución de patologías fibrosantes dérmicas como la cicatriz hipertrófica y queloide. Donde se han probado terapias tan variadas como la información que existe acerca de las patologías. Estas estrategias comprenden terapias físicas como la cirugía, la radiación y la presión; terapias químicas como ácidos corrosivos y soluciones fijadoras (formalina) y terapias farmacológicas como la administración de corticoides [24-28], interferón alfa 2b (IFN α 2b), la colágena polivinilpirrolidona [12,29]. Otras alternativas en el tratamiento de la cicatriz hipertrófica han sido los bloqueadores de la síntesis de colágena [30,31]; sin embargo, esos compuestos carecen de especificidad y pueden afectar el metabolismo de otros tejidos. Así que aún con todas estas terapias y las combinaciones de algunas de ellas no ha habido un éxito total, ya que la mayoría de los tratamientos resultan caros, incómodos o con efectos colaterales adversos, lo que deja un campo amplio para la investigación de nuevas estrategias terapéuticas que se puedan extrapolar a otros tipos de patologías fibrosantes, pues el componente predominante de tales procesos es el infiltrado inflamatorio crónico.

Referencias

1. Rut K Freinkel and David T Woodley. (2001) *Partenón Publishing, USA*.
2. Yang L, Scott PG, Dodd C, Medina A, Jiao H, Shankowsky HA, Ghahary A, Tredget EE. (2005) *Wound Rep. Reg.* **13**(4), 398-404
3. Quan TE, Cowper SE, Bucala R. (2006) *Curr. Rheumatol. Rep.* **8**(2), 145-50
4. Buccala R. (2006) Yale University, The School of Medicine, The Anlyan Center.

5. Postlethwaite A.E., Raghov R., Stricklin G.P., Poppleton H, Seyer J.M. y Kang A.H. (1988) *The Journal of Cell Biology* **106**, 311-318
6. Gailit J. y Clark R.A.F. (1994) *Current Opinion in Cell Biology* **6**, 717-725
7. Castagnoli C, Stella M, Berthod Ch, Magliacani G, Momigliano Richiardi P. (1993) *Cell Immunol.* **147**, 51-63
8. Castagnoli C, Stella M, Magliacani G, Ferrone S, Momigliano Richiardi P. (1994) *Burns* **20**(5), 430-433
9. Nwomeh BC, Liang H, Diegelmann RF, Cohen K, Yager DR. (1998) *Wound Rep. Reg.* **6**, 127-134
10. Clark RAF. (1995) *The molecular and cellular biology of wound repair*. Segunda edición. Plenum Press, New York, USA.
11. Hart J, Amin E, Harding KG. (1998) *Wound Rep. Reg.* **6**, A502
12. Krötzsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes-Márquez R, Quiróz-Hernández E and Díaz de León L. (1998) *J. Invest. Dermatol.* **111**, 828-834
13. Mast BA, Schultz GS. (1996) *Wound Rep. Reg.* **4**, 411-420
14. Yeh, Lin, Shen, Fang. (1999) *Burns* **25**, 131-136
15. Holbrook K.A. y Smith L.T. (1993) En: Peter M. Royce y Beat Steinmann. *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. Wiley-Liss, Inc. **59**, U.S.A.
16. Moriarty KP, Crombleholme TM, Gallivan EK, O'Donnell C. (1996) *Wound Rep. Reg.* **4**, 346-352
17. Mauch C., Eckes B., Hunzelmann N., Oono T., Kozłowska E. y Krieg T. (1993) *The Journal of Investigative Dermatology* **100**, 92S-96S
18. Ehrlich HO, Krummel TM. (1996) *Wound Rep. Reg.* **4**, 302-210
19. Morris DE, Wu L, Zhao LL, Bolton L, Roth SI, Ladin DA y Mustoe TA. (1997) *Plast. Reconstr. Surg.* **100**, 674-681
20. McPherson JM, Piez KA. (1988) En: Clark RAF, Henson PM. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York, Plenum Press, 471-496.
21. Rockwell WB, Cohen IK, Ehrlich HP. (1989) *Plast. Reconstr. Surg.* **84**, 827-837
22. Thomas DW, Hopkinson I, Harding KG, Shepherd JP. (1994) *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* **23**, 232-236
23. Schierle HP, Scholz D y Lemperle G. (1997) *Plast. Reconstr. Surg.* **100**, 390-395
24. Darzi MA, Chowdri NA. (1992) *Br. J. Plast. Surg.* **45**(5), 374
25. Lawrence WT. (1991) *Ann. Plast. Surg.* **27**(2), 164
26. Ahn ST, Monafó WW, Mustoe TA. (1991) *Arch. Surg.* **126**, 499-504
27. Soderberg T, Hallimans G, Bartholdson L. (1982) *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* **16**:261
28. Tang YW. (1992) *Br. J. Plast. Surg.* **45**(5), 371
29. Furuzawa-Carballeda J, Krötzsch E, Espinosa-Morales R, Alcalá M, Barile-Fabris L. (2005) *Clinical and Experimental Dermatology* **30**, 83-86
30. Rosenbloom J, Feldman G, Freundlich B, Jimenez SA. (1986) *Arthritis Rheum.* **29**, 851-856
31. Kawaguchi Y, Harigai M, Kitani A, Suzuki K, Kawakami M, Ishizuka T, Hidaka T, Hara M, Kawagoe M, Nakamura H. (1992) *J. Rheumatol.* **19**, 1710-1715

Semblanza del Dr. Edgar Kröttsch



El Dr. Edgar Kröttsch es Químico Farmacéutico Biólogo, con formación bioquímica microbiológica en la UNAM, trabajó para la industria en el área de control de calidad, tanto en alimentos, como farmacia y tratamiento de aguas residuales. Posteriormente realizó estudios de maestría y doctorado en investigación biomédica básica en el área de biología celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, enfocándose a las secuelas del proceso de reparación cutáneo. Con ese tema realizó tesis de maestría y doctorado evaluando la fisiopatología in-vitro e in-vivo en la cicatrización y sus secuela fibrosa, la cicatriz hipertrófica. Asimismo, exploró y

describió el mecanismo de acción de la colágena-polivinilpirrolidona en la fibrosis cutánea, lo que lo llevó a generar nuevos proyectos relacionados con la farmacología de la cicatrización. Ha colaborado en otras áreas de la reparación de tejidos blandos y duros, y ha publicado como coautor en las mismas. Derivado de una colaboración, ha participado en el estudio de la angiogénesis terapéutica, de donde se han derivado varios trabajos relevantes en el campo. Su productividad actual es de dieciocho publicaciones nacionales e internacionales, dos capítulos de libros, dos patentes, una nacional y otra internacional, es colaborador con la industria farmacéutica nacional e internacional para la evaluación de estrategias terapéuticas relacionadas con los procesos de reparación. En cuanto a la formación de recursos humanos, ha dirigido y dirige tesis de licenciatura, especialidad, maestría y doctorado en ciencias médicas y biológicas y ha graduado ocho alumnos.

También el Dr. Kröttsch ha impartido cursos, talleres, conferencias y participado en congresos a nivel nacional e internacionalmente en más de cien ocasiones. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores desde el año 2000 y actualmente está vigente hasta el 2011 como Nivel I. Fue nombrado miembro de la COFEPRIS en 2002 y 2003, así como miembro de la Comisión de Evaluación para el Fondo Sectorial de Investigación en Salud del CONACYT del 2005 al 2008.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXXIII**. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

CÉLULAS TRONCALES Y HEMATOPOYESIS

Héctor Mayani

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología,
Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social,
México D.F., México
hmayani@prodigy.net.mx

Resumen

Las células troncales somáticas son células no diferenciadas con una alta capacidad de autorenovación, que pueden dar origen a uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo. La caracterización a fondo de estas células ha sido difícil debido a que su frecuencia en los distintos tejidos corporales es extremadamente baja y a que su identificación no se basa en su morfología sino en ensayos inmunofenotípicos y funcionales. Sin embargo, en la última década se han logrado avances significativos en el estudio de estas células tanto a nivel celular como molecular. La mayor parte del conocimiento que tenemos sobre la biología de las células troncales somáticas proviene del trabajo realizado con células troncales hematopoyéticas. Sin embargo, más recientemente, se ha producido una gran cantidad de información sobre células troncales nerviosas y epiteliales. La importancia de la investigación con células troncales ha rebasado el campo de la biología básica y está contribuyendo en la actualidad al desarrollo de nuevos enfoques para el tratamiento de trastornos hematológicos, neurológicos, autoinmunes y metabólicos (terapia celular).

Palabras clave: Células troncales somáticas, células troncales hematopoyéticas, nerviosas y epiteliales.

Abstract

Somatic stem cells are undifferentiated cells with a high capacity for self-renewal, that can give rise to one or more specialized cell types with specific functions in the body. Profound characterization of these cells has been difficult, due to the fact that their frequency in different tissues of the body is extremely low; furthermore, their identification is not based on their morphology but on immunophenotypic and functional assays. Nevertheless, significant advances in the study of these cells, both at the cellular and molecular levels, have been achieved during the last decade. Most of what we know about somatic stem cell biology has come from work on hematopoietic stem cells. More recently, however, there has been a great amount of information on neural and epithelial stem cells. The importance of stem cell research has gone beyond basic biology and is currently contributing to the development of new medical approaches for the treatment of hematological, neurological, autoimmune and metabolic disorders (cellular therapy).

Keywords: Somatic stem cells, hematopoietic, neuronal, epithelial stem cells.

Introducción

Hace más de 40 años se reconoció que en algunos tejidos existen células “maestras” capaces de dar origen a todos los distintos tipos celulares del tejido en el que se localizan. Estas *células troncales* somáticas, se identificaron por primera vez en el sistema hematopoyético de ratones [1], sin embargo, a lo largo de los años, se ha demostrado su presencia en otros tejidos como la epidermis, el músculo, el hígado y hasta en el cerebro [2,3].

Actualmente, se ha generado gran expectativa y controversia alrededor de las células troncales. Cientos de laboratorios de todo el mundo están trabajando en la identificación, purificación, cultivo *in vitro* y la manipulación genética de células troncales provenientes de distintas fuentes. Algunas compañías biotecnológicas han puesto su atención en estas células. En 1999, la prestigiosa revista Science consideró el hallazgo sobre el “verdadero” potencial y plasticidad de las células troncales como el “descubrimiento del año” [4], y durante los últimos dos años los gobiernos de E.U.A. y varios países europeos han debatido sobre el financiamiento y el uso experimental de las células troncales embrionarias humanas (CTE; un tipo particular de células troncales generadas en la embriogénesis temprana).

Más allá de los intereses sociales, políticos, morales y económicos, es evidente que la biología de las células troncales es un asunto candente, particularmente en la biología y la medicina, debido a su relevancia para el entendimiento de procesos biológicos básicos como la proliferación y la diferenciación celular, y también por su posible uso para el tratamiento de diversos trastornos como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, la diabetes y el cáncer.

En los últimos años se ha generado una gran cantidad de información sobre la biología de las células troncales, lo que ha dado como resultado el desarrollo de nuevos conceptos y la reconsideración de muchos conceptos “clásicos”. En este contexto, el objetivo principal de este artículo es hacer una revisión breve pero lo más completa posible sobre esta “nueva” biología de las células troncales. Es importante mencionar que la mayor parte del conocimiento que tenemos sobre la biología de las células troncales se ha generado en estudios sobre las células troncales hematopoyéticas (CTH), tanto de murinos como de humanos; por lo tanto, en esta revisión se hará un mayor énfasis en estas células formadoras de sangre y se revisarán con menor profundidad las células nerviosas y epiteliales.

¿Qué es una célula troncal?

La definición de célula troncal debe basarse en términos funcionales, ya que estas células no poseen características morfológicas que puedan distinguirlas del resto de las células del tejido a las que pertenecen. En este contexto, las células troncales se han definido como células no diferenciadas con una alta capacidad de autorenovación que pueden dar origen a uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo; las células troncales se sitúan al inicio del linaje de un tejido determinado [5-7].

En la mayoría de los casos, entre las células troncales y su progenie totalmente diferenciada existe una población intermedia de células progenitoras comprometidas con una capacidad proliferativa limitada y un restringido potencial de diferenciación. Una de las principales funciones de esta población intermedia es incrementar el número de células diferenciadas por cada división de las células troncales. En tejidos como la epidermis interfolicular, el resultado final es la generación de un amplio número de células maduras del mismo tipo, el queratinocito [8]. En contraste, en tejidos como la sangre, de una sola CTH se pueden originar grandes cantidades de 9 distintos tipos de células maduras (eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos T, linfocitos B, y células NK) (Figura 1). La tasa de producción de células maduras a partir de las células troncales varía considerablemente entre los distintos tejidos. En la epidermis y la sangre, donde las células maduras tienen una vida muy corta, se generan millones de células diariamente (en un hombre de 70 kg se producen 10^{10} eritrocitos y 4×10^8 leucocitos cada hora) [9]. En contraste, la producción de células maduras es muy baja en tejidos con una regeneración o recambio celular limitados como el hígado o el cerebro (una estimación conservadora indica que en ratas y ratones cada día se produce una neurona por cada 2,000 neuronas existentes) [10].

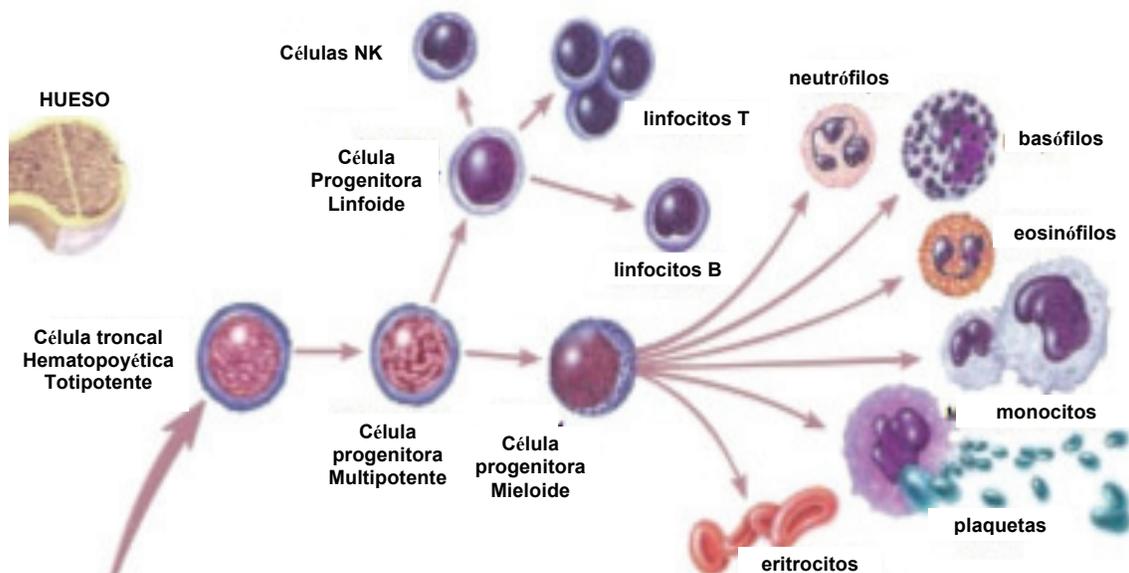


Figura 1. Diferenciación de células troncales hematopoyéticas a células progenitoras, las cuales darán origen a distintas células maduras.

Tipos de células troncales generadas durante el desarrollo

A lo largo del desarrollo de los mamíferos se generan diversos tipos de células troncales. El huevo fertilizado, o cigoto, es una célula troncal *totipotencial* capaz de producir todos los tipos celulares de un animal, incluyendo a las células que no formarán parte del embrión, como las células de la placenta [11]. Hasta el estadio de mórula (8 células), cada célula es idéntica a las otras; todas son células troncales totipotenciales. Conforme avanza el desarrollo, el embrión alcanza el estadio de blastocisto, en el que cada célula que forma parte de la masa celular interna es capaz de producir todas las células del embrión, pero no las estructuras extraembrionarias. Estas células troncales *embrionarias* (CTE), ampliamente utilizadas en la generación de animales transgénicos, tienen la capacidad de formar cualquier célula del organismo completamente diferenciada [12]; sin embargo, bajo condiciones de cultivo específicas, pueden ser inducidas a una proliferación ilimitada sin diferenciación [13].

A partir de las CTE se producen diferentes células somáticas, incluyendo aquellas que dan origen al sistema nervioso central, a los nervios periféricos, la sangre, el hígado, el páncreas, el músculo, etc. Sin embargo, durante el desarrollo se produce un tipo diferente de células troncales no somáticas: las células troncales *germinales*, que migran a las gónadas en desarrollo (crestas genitales) y eventualmente dan lugar a los gametos [14].

¿Cómo se identifican las células troncales somáticas?

Como se mencionó anteriormente, las células troncales somáticas no poseen características morfológicas que puedan utilizarse para su identificación; por lo tanto, actualmente la forma de reconocer estas células involucra tanto análisis inmunofenotípicos como ensayos funcionales *in vivo* e *in vitro*. La mayoría de las CTH humanas expresan los antígenos CD34 y CD90, así como un bajo nivel del receptor *c-kit* (CD117) y no expresan los antígenos CD38, HLA-DR, CD45RA, CD71 o cualquier otro antígeno específico de algún linaje celular, por lo tanto, son células linaje negativas [15-17]. Es interesante observar que, al contrario del "dogma" establecido hace una década, los reportes recientes indican que una subpoblación de CTH no expresan el antígeno CD34, es decir, son células CD34⁻ CD38⁻ linaje negativas [18,19]; de hecho, las CTH CD34⁺ pueden generarse a partir de estas últimas [20]. De la misma manera, las CTH de murino expresan un alto nivel de Sca-1, H-2K, y AA4.1, y un bajo nivel de *c-kit* y CD90, y son también células linaje negativas [15,21]. Además, la mayor parte de la población de CTH, tanto de humanos como de murino, permanece en la fase G₀ del ciclo celular [22].

Funcionalmente, las CTH se identifican por su capacidad de repoblar *in vivo* todo el sistema hematopoyético de animales mielosuprimidos. Estos estudios se realizan transplantando CTH de murino en ratones irradiados [23]; también se pueden realizar estudios similares introduciendo estas células a ratones inmunodeficientes (SCID, por sus siglas en inglés) [24]. *In vitro*, las CTH se definen por su capacidad de iniciar y sostener la hematopoyesis a largo plazo en cultivos líquidos en presencia de una capa de células adherentes formada por elementos del estroma [25].

La identificación de las células troncales del sistema nervioso central (SNC) –aquellas que dan origen a las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos– depende también del uso de distintos marcadores, los cuales han sido menos caracterizados con respecto a las CTH. Entre los pocos marcadores que se han descrito para las células del SNC, la nestina, proteína del filamento intermedio, es la más utilizada [26,27]. Otros marcadores, como la GFAP, la vimentina y la A2B5, se han utilizado también para la identificación de células nerviosas primitivas o neuroblastos [28].

La actividad de célula troncal de las células nerviosas primitivas se ha probado tanto *in vivo* como *in vitro*. Las células troncales nerviosas pueden transplantarse en cerebro de ratas

adultas, donde son capaces de producir neuronas y glía, entre otras células [29,30]. Es interesante observar que la capacidad de diferenciación de estas células depende en gran medida del tejido en el que sean transplantadas, lo cual sugiere que el microambiente en el que se desarrollan influye de alguna manera en su diferenciación. Las neuronas generadas *in vivo* después del trasplante de células troncales tienen actividad eléctrica y conexiones funcionales, exhiben eventos postsinápticos espontáneos e inducidos y responden a la aplicación local de glutamato [31].

In vitro, las células troncales del SNC son capaces de crecer en cultivos líquidos como monocapas adherentes o como agregados flotantes conocidos como neuroesferas [32,33]. Cuando estas últimas estructuras se cultivan en condiciones apropiadas pueden dar lugar a diferentes tipos celulares maduros como neuronas y glía.

Frecuencia y localización espacial de las células troncales

En cualquier tejido la frecuencia de células troncales es muy baja. Esto es particularmente cierto en el sistema hematopoyético de mamíferos. En la vida postnatal, la médula ósea se convierte en el sitio principal de producción de células sanguíneas y la mayoría de las CTH se localizan en este tejido. Aquí, la proporción de CTH es de 1 por cada 2×10^5 células (es decir, conforman el 0.01% - 0.005% del total de células de médula ósea). Se estima que en humanos normales hay aproximadamente 50 millones de CTH, algunas de las cuales pueden producir hasta 10^{13} células sanguíneas maduras en un periodo de vida normal. Al contrario de lo que algunos pueden pensar, la localización exacta de las CTH dentro de la médula ósea no es azarosa. La mayoría de estas células se localizan dentro de la región endosteal, mientras que los progenitores comprometidos hacia un linaje determinado y las células maduras se distribuyen lejos de esta región, predominantemente en la región central de la médula ósea, cerca de los vasos sanguíneos [34-36].

Las células troncales nerviosas también parecen estar localizadas en áreas específicas del SNC. Varias regiones del cerebro de roedores adultos se han identificado como fuentes ricas de dichas células: la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo [37]. También existe evidencia de que un número significativo de células troncales nerviosas se localiza en la zona subependimial; de hecho, las células obtenidas de esta región son capaces de autorenovarse y diferenciarse en neuronas y glía [38]. Recientemente se aislaron células troncales nerviosas del bulbo olfatorio de humanos adultos y se estableció que aproximadamente 1% del total de células de este tejido son células troncales capaces de autorenovarse y de producir neuronas, astrocitos y oligodendrocitos [39].

En la capa epidérmica de la piel, las células troncales se localizan en la membrana basal. Es interesante observar que la frecuencia de células troncales en este tejido es mayor que la frecuencia de células troncales en médula ósea y cerebro. De hecho, se ha sugerido que aproximadamente 10% de la población de células de la membrana basal son células troncales [40,41].

¿Cómo se regula la función celular?

La viabilidad, autorenovación, proliferación, compromiso y diferenciación de las células troncales depende de factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Los primeros involucran a una variedad de moléculas reguladoras presentes en la célula de acuerdo con el tejido o linaje al que pertenece; los segundos, incluyen a todos los tipos celulares y sus productos que forman parte del microambiente en el que la célula se desarrolla. En otras palabras, la función de las células troncales depende en última instancia de factores reguladores intrínsecos que son modulados por señales externas [42-48].

Elementos intrínsecos

Los factores reguladores intrínsecos de las células troncales incluyen a proteínas responsables de inducir divisiones celulares simétricas y asimétricas, factores de transcripción nuclear que controlan la expresión de los genes, reguladores moleculares del ciclo celular; y moléculas que actúan como relojes mitóticos y que establecen el número de ciclos de división posibles dentro de la población. Como se mencionó anteriormente el destino de las células troncales puede estar influenciado por ciertas proteínas citoplasmáticas o membranales heredadas por cada célula hija durante la división mitótica. Las divisiones simétricas y asimétricas de las células troncales dependen de una distribución homogénea o heterogénea de dichas proteínas [43]. *Notch 1* parece ser un claro ejemplo [48].

Existe evidencia contundente de que los factores de transcripción controlan el destino de las células troncales. Por ejemplo, dentro del sistema hematopoyético, es posible que la expresión coordinada de los genes que determinan un linaje específico esté mediada, por lo menos en parte, por la activación/supresión programada de factores de transcripción específicos para determinados tejidos o estadios celulares, dirigida por el microambiente en el que la célula se encuentra. De hecho, cada linaje hematopoyético está controlado por combinaciones únicas de factores de transcripción, los cuales se expresan individualmente en varios linajes. La lista de estas proteínas nucleares es bastante amplia e incluye factores como SCL, PU.1, GATA-1, GATA-2, CBF β , NF κ B y la familia de genes homeóticos, entre otros [49-52]. Los cambios en algunos de estos factores pueden causar cambios significativos en el balance celular y de linajes dentro del sistema hematopoyético [49-53]. Se ha establecido claramente que algunos de estos factores son absolutamente necesarios para que se realice la hematopoyesis. Por ejemplo, se ha demostrado que la generación de células hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario es totalmente dependiente de la presencia de SCL; sin esta molécula no hay producción de células sanguíneas y los animales mueren [54]. Por lo tanto este factor de transcripción debe estar presente en las CTH embrionarias y fetales.

También se han reconocido algunos factores de transcripción como clave en la regulación de la función de las células troncales nerviosas y epiteliales [55,56]. Entre las distintas proteínas, los miembros de la familia de genes bHLH, particularmente las *neurogeninas*, juegan un papel esencial en la promoción de la neurogénesis durante el desarrollo. Por otro lado, el factor de transcripción *Math1*, está involucrado en la generación de enterocitos, células goblet, células enteroendócrinas y de Paneth a partir de una célula troncal multipotencial en el epitelio del intestino delgado de ratón [57].

Las etapas del ciclo celular están fuertemente asociadas con la función de las células en cada paso de la hematopoyesis. Para la autorenovación de las CTH es necesario un ciclo celular lento o quiescencia; para la expansión efectiva de la población de células progenitoras se requiere un ciclo celular rápido de las células totalmente diferenciadas, en las cuales la suspensión del ciclo celular es apropiada y en algunas ocasiones necesaria [58]. No se conocen completamente los mecanismos de regulación del ciclo celular de las CTH, sin embargo, algunas de las moléculas involucradas en este proceso están siendo identificadas. Para mencionar un ejemplo, recientemente se demostró que la quiescencia se mantiene gracias a un regulador del punto de control G₁, el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p21^{cip1/waf1}. De hecho, los estudios realizados *in vivo* en ratones demuestran que la ciclina p21^{cip1/waf1} es el interruptor que gobierna la entrada de las células troncales al ciclo celular, y que en su ausencia, la constante proliferación de las células conduce al agotamiento de la reserva de células troncales [59].

Existe una fuerte evidencia sobre el papel de la longitud de los telómeros como reloj mitótico en células somáticas. Durante el desarrollo de los tejidos somáticos, los telómeros se acortan progresivamente conforme las células se dividen; una vez que estas estructuras cromosomales alcanzan una longitud crítica, la célula es incapaz de dividirse y envejece [60]. En los estudios con células del sistema hematopoyético se ha observado esta misma función de los

telómeros en las células troncales, particularmente en relación con la capacidad de proliferación de estas células “maestras”. De hecho, los estudios *in vitro* con CTH humanas purificadas a partir de distintos tejidos demuestran que el potencial proliferativo de células con telómeros largos – como las células derivadas de hígado fetal – es significativamente mayor al de células con telómeros cortos – como las células de la médula ósea de adultos [61,62]. A este respecto es importante observar que la telomerasa, complejo enzimático que mantiene los telómeros añadiendo secuencias teloméricas repetidas (TTAGGG) al extremo 3’ de los cromosomas humanos [63], muestra una actividad basal en las CTH que disminuye conforme las células se inducen hacia la proliferación [64].

La longitud de los telómeros en las células troncales nerviosas humanas es muy similar a la observada en las CTH humanas (esto es, los fragmentos de restricción de los telómeros en ambos tipos celulares miden aproximadamente 12kpb) [61,65]. De modo similar a las CTH, las células troncales nerviosas expresan bajos niveles de telomerasa; y es interesante observar que su actividad disminuye hasta niveles no detectables después de que las células han sido inducidas a proliferar en cultivo. Por lo tanto, la biología de los telómeros y la telomerasa en ambos tipos celulares muestra similitudes significativas.

Otras moléculas involucradas en la función de las células troncales incluyen a ciertos oncogenes y genes supresores de tumores. Entre los últimos, es particularmente importante el papel recientemente reportado del gen supresor de tumores *Pten*, como regulador de la proliferación de las células troncales nerviosas y del tamaño del soma de las neuronas [66].

Elementos extrínsecos

Las células troncales se desarrollan dentro de microambientes específicos constituidos por distintos tipos celulares y sus productos. En conjunto estos elementos externos proporcionan señales que controlan la conducta de las células troncales, modulando la expresión y la actividad de los elementos intrínsecos presentes en la célula.

En la vida postnatal, la formación de células sanguíneas se realiza principalmente en la médula ósea. Aquí, las células troncales están rodeadas de distintos tipos celulares, incluyendo células del estroma (fibroblastos, adipocitos, macrófagos y células endoteliales) y células accesorias (como los linfocitos). Estas células producen y secretan una variedad de proteínas, incluyendo a las de matriz extracelular y citocinas, que afectan la fisiología de las células troncales [67,68]. Dicho microambiente hematopoyético es crucial para la regulación de la hematopoyesis y la alteración de algunos de sus componentes puede contribuir al desarrollo de enfermedades hematológicas [69].

La citocinas hematopoyéticas son componentes clave del microambiente hematopoyético y hasta la fecha se han identificado más de 20 reguladores hematopoyéticos incluyendo interleucinas, factores estimuladores de colonias, quimiocinas, entre otros. De hecho, este grupo de proteínas – producidas tanto por células del estroma como por células accesorias- constituyen los signos básicos que regulan la función de las células troncales. Las citocinas pueden presentarse ante las células troncales blanco como moléculas solubles o como moléculas unidas a membranas [70-72], y ejercen sus efectos a través de receptores específicos en la membrana celular [73]. El hecho de que algunas citocinas se presenten como proteínas unidas a membranas implica que debe existir una interacción directa entre la célula productora de citocinas y la célula que contiene el receptor para dicha citocina. Las actividades principales de las citocinas sobre las células troncales parecen ser prevenir la muerte celular y promover la división. Sin embargo, todavía existe controversia acerca de si las citocinas regulan la autorenovación *versus* la diferenciación, así como el compromiso de las CTH hacia un linaje celular específico.

Algunos estudios *in vitro* sugieren que las citocinas afectan el compromiso del linaje hematopoyético [74-76]. Sin embargo, la mayor parte de la evidencia experimental generada en las últimas tres décadas apoyan la noción de que la autorenovación y la diferenciación de las CTH, así como el compromiso hacia un linaje específico, se produce a través de mecanismos moleculares que no parecen estar influenciados por las citocinas hematopoyéticas. Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que mientras que la sobreexpresión del factor de transcripción PU.1 induce la diferenciación hacia un linaje mielomonocítico en células eritroleucémicas de murino [77], la expresión del receptor de eritropoyetina por las células progenitoras pluripotenciales no induce la diferenciación hacia el linaje eritroide, ni la expresión del receptor para el factor estimulador de colonias de macrófagos induce la diferenciación hacia el linaje monocítico en estas mismas células [78]; estos resultados sugieren que, a diferencia de las citocinas hematopoyéticas, los factores de transcripción son moléculas clave en el compromiso de las CTH. El papel de las citocinas en la diferenciación hematopoyética será el de factores permisivos que promuevan la sobrevivencia, la proliferación y la maduración de las células progenitoras generadas por las CTH. Por lo tanto, aunque el compromiso y la diferenciación parecen estar reguladas por una compleja red de elementos intrínsecos, a nivel de la población de células troncales la hematopoyesis se considera un proceso estocástico [79,80].

Las células troncales nerviosas también dependen de la presencia de ciertas citocinas para su sobrevivencia y proliferación *in vivo* e *in vitro* como por ejemplo, el factor básico de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento epidérmico [81,82]. Es interesante observar que, en contraste con las CTH, parece no haber duda de que las señales externas generadas por el microambiente juegan un papel instructivo en el destino de las células troncales nerviosas [83,84]. De hecho, los experimentos *in vivo* en los se implantaron células troncales nerviosas en cerebro de roedores demuestran que el destino de las células implantadas parece estar dictado por el ambiente local más que por las propiedades intrínsecas de las células. Por tanto, cuando las células se implantaron en el cerebro en desarrollo, las células troncales fetales y las células progenitoras inmortalizadas migraron junto con las células del hospedero y se diferenciaron en el tipo celular específico de la región blanco [85,86]. Los estudios en los que células troncales obtenidas del hipocampo de adultos se expanden *in vitro* y se implantan de regreso en el hipocampo demuestran la generación de nuevas neuronas y glía; sin embargo, estas mismas células generaron neuronas del bulbo olfatorio cuando se implantaron en la corriente rostral migratoria [87,88].

In vitro, el destino de las células troncales nerviosas parece estar regulado por señales externas. El factor de crecimiento derivado de plaquetas induce a las células troncales a diferenciarse en neuronas; en contraste, el factor neurotrófico ciliar y la hormona tiroidea T3 actúan instructivamente sobre las células troncales para generar clones de astrocitos y oligodendrocitos, respectivamente. Estas observaciones difieren claramente de las hechas con CTH derivadas de distintos tejidos hematopoyéticos (hígado fetal, médula, timo, bazo y sangre) expuestas a ambientes de diferenciación mieloide o linfoides utilizando sistemas *ex vivo*. En estos estudios, las capacidades funcionales de las CTH siempre se relacionaron con el tejido original y las alteraciones en el medio de diferenciación *ex vivo* no condujo a cambios en el resultado [88].

Cambios en la función de las células troncales relacionados con la ontogenia

¿Cambia la función de las células troncales somáticas durante la ontogenia? La respuesta a esta pregunta parece ser afirmativa, al menos para las CTH. La observación de que las CTH pueden encontrarse en el saco vitelino, el hígado fetal y en varios tejidos hematopoyéticos de mamíferos adultos contribuyó al concepto clásico de que las células troncales representan un tipo único de células inmortales presentes en números variables en los tejidos en distintos estados de desarrollo. Sin embargo, los estudios recientes tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que las CTH muestran cambios funcionales significativos durante la

ontogenia, lo que sugiere que estas células no son iguales a lo largo del desarrollo. Cuando las CTH de hígado fetal o médula ósea adulta de ratón se transplantaron en ratones irradiados, se observó que el potencial de repoblación de las primeras excedió al de las últimas [90]. Los estudios *in vitro* con células hematopoyéticas troncales/progenitoras de humano obtenidas de distintas fuentes, también demostraron que las células derivadas de tejidos fetales (es decir, el hígado) poseen potenciales de proliferación y expansión superiores a los de las células derivadas de tejidos adultos (médula ósea) [91]. Interesantemente, los potenciales de proliferación y expansión de las CTH provenientes de la sangre de cordón umbilical son superiores a los de las células de médula ósea, pero inferiores a las de las células de hígado fetal [91,92]. Por lo tanto, se puede concluir que la tasa de recambio y el potencial de proliferación de las CTH disminuyen marcadamente durante el desarrollo de los mamíferos [93].

Las observaciones anteriores se correlacionen con el hecho de que las CTH derivadas del hígado fetal poseen telómeros más largos que las CTH derivadas de la sangre de cordón umbilical o de la médula ósea, y que las células de sangre de cordón umbilical, por su parte, poseen telómeros más largos que las células de médula ósea. Con base en éstos y otros estudios sobre la biología de la CTH, Lansdorp ha sugerido que la longitud del telómero actúa como un reloj mitótico en las CTH, determinando la capacidad proliferativa de dichas células. Estos hallazgos son difíciles de reconciliar con el concepto de que la célula troncal es un tipo celular inmortal e invariable. En otras palabras, es posible que no exista una “verdadera” autorenovación de las células troncales. Sin embargo, considerando el tamaño de la población de células troncales en el momento del nacimiento, el hecho de que una CTH pueda generar hasta 10^{13} células maduras y la dinámica de la población de células troncales, la falta de una “verdadera” autorenovación no tendrá impacto sobre la hematopoyésis, ya que el número de CTH que un individuo posee puede ser más que suficiente para mantener la producción de células sanguíneas durante toda su vida.

Plasticidad de las células troncales

Hasta hace poco tiempo, el concepto general con respecto a la biología de las células troncales somáticas era que su potencial de diferenciación estaba restringido a un sistema orgánico individual; en este sentido, las CTH producirían únicamente células sanguíneas; las células troncales nerviosas darían lugar únicamente a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos; las células satélite del músculo a células musculares y así sucesivamente. Sin embargo, durante los últimos 5 años, los estudios *in vivo*, principalmente en ratones, han generado una gran cantidad de evidencia que indica que este concepto pudiera no ser cierto. Aunque sigue siendo un tema controversial y la evidencia no es concluyente, es probable que la plasticidad de diferenciación de las células troncales somáticas es mayor de lo que se había estipulado [94].

Plasticidad de las CTH

Hace solamente 4 años, se reportó que las células de la médula ósea son capaces de generar células musculares *in vivo*. Esto se demostró en estudios animales en los que se transplantó médula ósea completa en ratones. Utilizando marcadores específicos, se demostró que las células de médula trasplantadas dieron lugar a miocitos en el hospedero [95,96]. Estudios posteriores con CTH purificadas demostraron que estas células tienen el mismo potencial miogénico que la médula ósea completa [97]. Otra evidencia del potencial miogénico de las células derivadas de la médula provino de estudios en los que las células purificadas de médula ósea de ratones adultos regeneraron vasos sanguíneos y cardiomiocitos al ser inyectadas en ratones con infarto de miocardio [98].

En otro grupo de experimentos con un modelo de trasplantes similar al anterior, se demostró que las células de médula ósea pueden dar origen también a hepatocitos y otras

células hepáticas [99]. Los hepatocitos derivados de médula ósea también pueden desarrollarse en humanos, como se demuestra en estudios con pacientes femeninas que recibieron trasplantes de médula ósea de donadores masculinos [100,101]. En estudios más recientes con ratones se demostró que la población de células troncales de médula ósea con el potencial de generar hepatocitos tiene el siguiente inmunofenotipo: Sca-1⁺ CD90^{low} CD117⁺ Lin⁻ [102].

Las células de médula ósea pueden generar también células nerviosas. El trasplante de células de médula ósea de ratón adulto marcadas genéticamente, en ratones adultos irradiados letalmente, produjo el desarrollo en el sistema nervioso central de células derivadas del donador que expresan proteínas neuronales y que se observó hasta 6 meses después del trasplante [103]. En un estudio diferente, las células de médula ósea de adulto se transplantaron en una cepa de ratones incapaces de producir células mieloides o linfoides. Cuatro meses después del trasplante, el sistema hematopoyético de los organismos transplantados se repobló en su totalidad; y se detectaron también células derivadas del donador que expresaban antígenos específicos de las neuronas [104].

Es importante observar que la plasticidad de las CTH se ha demostrado a nivel de una sola célula; de hecho, la inyección intravenosa de una sola CTH produjo una progenie que se diferenció en células epiteliales en hígado, pulmón, riñón e intestino [105]. Esta evidencia apoya fuertemente la existencia de CTH con un potencial de diferenciación no hematopoyético. Todavía se tiene que esclarecer si todas las CTH o sólo una subpoblación de estas células tienen dicho potencial.

Terapia Celular

La terapia celular se ha definido como la transferencia de células vivas a un individuo hospedero intacto con la intención de introducirle nuevas funciones o de corregir funciones defectuosas [106]. El atractivo y la promesa de la terapia celular se derivan del hecho de que las células blanco pueden ser manipuladas *ex vivo*, tanto a nivel celular como molecular.

Sin lugar a dudas, los trasplantes de células hematopoyéticas constituyen el mejor ejemplo actual de terapia celular basada en células troncales que está siendo aplicada a la clínica. Por este procedimiento, las CTH alogénicas o autólogas (normalmente transplantadas en combinación con células progenitoras y maduras) reconstituyen la hematopoyesis de individuos cuyo sistema ha sido afectado por un trastorno hematopoyético (ej., leucemia o anemia aplásica) o por radioterapia y/o quimioterapia, como parte del tratamiento de un tumor sólido [107]. Tradicionalmente, las células hematopoyéticas transplantadas se obtienen de médula ósea, sin embargo, durante los últimos 10 años, se están utilizando con mayor frecuencia CTH de sangre periférica movilizada [108] y más recientemente de sangre de cordón umbilical [109].

El trasplante de células hematopoyéticas se ha convertido en un método de terapia estándar; sin embargo, el trasplante de CTH manipuladas *ex vivo* se encuentra todavía en una fase inicial. Como se mencionó previamente en esta revisión, se han diseñado diversos enfoques experimentales para la expansión *ex vivo* de CTH y su progenie inmediata (progenitores hematopoyéticos), con poblaciones de células purificadas o de células primitivas enriquecidas, con el objetivo final de generar nuevas CTH, células progenitoras o células maduras [110-113]. Por otro lado, también se han desarrollado estrategias para la manipulación genética de estas células [114]. La evidencia experimental en modelos animales, y los estudios de laboratorio con células animales, indican que los trasplantes de CTH manipuladas *ex vivo* serán de gran relevancia en el futuro inmediato.

Existen dos reportes sobre el tratamiento de niños con inmunodeficiencia severa combinada (SCID, por sus siglas en inglés), por medio del trasplante de CTH genéticamente modificadas. En el primer estudio [115], se identificaron tres mujeres heterocigotas para la

deficiencia de adenosin desaminasa (ADA) cuyos fetos eran ADA deficientes. Después del nacimiento a término de sus hijos, se colectaron células de sangre de cordón umbilical (SCU), y se obtuvieron las células CD34⁺ por métodos estándar. Las células CD34⁺ fueron transducidas por medio del vector retroviral LASN, que contenía el gen TK-neo – que confiere la resistencia al fármaco G418, usado como marcador- y el gen normal ADA de humano. Al cuarto día después del nacimiento, las células CD34⁺ transducidas fueron reintroducidas a sus respectivos donadores por infusión i.v. Después de 18 meses de realizado el trasplante, se observó la presencia del vector LASN en granulocitos y células mononucleares de la médula ósea de los tres pacientes en una proporción aproximada de 1/10,000 células. Una frecuencia similar se observó en los leucocitos de sangre periférica. Se encontró también que una pequeña pero significativa proporción de progenitores mieloides era resistente a G418. De acuerdo con este reporte, no se han presentado efectos adversos a causa de la administración de células de SCU después de 18 meses del trasplante. La administración continua de terapia de reemplazo de la enzima ADA permitió a los pacientes el desarrollo de una función inmune normal y permanecer libres de infecciones.

En el segundo y más reciente estudio [116], se utilizaron células CD34⁺ de médula ósea genéticamente modificadas para tratar a dos pacientes (11 y 8 meses de edad) con el trastorno hereditario SCID-X1, y ligado a X caracterizado por un bloqueo temprano en la diferenciación de las células T y N, causado por mutaciones en el gen del receptor de la citocina γ_c , subunidad de los receptores de las interleucinas -2, -4, -7, -9, y -15. Las células CD34⁺ con el transgen γ_c , obtenidas de estos pacientes, fueron reintroducidas en ambos. Después de un periodo de seguimiento de 10 meses, en los recuentos de células T, B y NK en ambos pacientes se detectaron células transducidas y su función fue comparable a las células control obtenidas de pacientes de la misma edad. Este reporte representa la primera prueba real de que la terapia génica, junto con un procedimiento de terapia celular, puede producir la corrección total de un fenotipo enfermo y proporcionar un beneficio clínico.

El trasplante *in útero* de CTH también ha surgido como una modalidad potencialmente valiosa dentro del campo de la terapia celular. Como se ha demostrado en estudios recientes, este enfoque se ha aplicado con éxito para el tratamiento de SCID [117]; sin embargo, en otros trastornos el injerto ha sido mínimo o nulo, lo que sugiere la presencia de barreras importantes al injerto dentro del ambiente fetal. Se espera que en el futuro cercano, se determinen los mecanismos involucrados en dichas barreras y que el trasplante de CTH *in útero* se transforme en una modalidad posible de terapia celular.

A partir de los estudios analizados anteriormente y considerando una serie de estudios reportados en la última década, que no fueron discutidos en esta revisión, es evidente que la terapia celular con CTH será perfectamente posible en el futuro inmediato. También es evidente que la terapia celular irá más allá del uso de CTH para el tratamiento de los trastornos hematológicos. De hecho la generación *ex vivo* de neuronas, hepatocitos o músculo cardíaco a partir de sus respectivas células troncales tendrá implicaciones significativas en el tratamiento de distintos trastornos. Es más, muchos de los estudios discutidos anteriormente en este artículo en los que se demuestra la plasticidad de las células troncales somáticas, proporcionan evidencia de que las células troncales, bajo una correcta manipulación *ex vivo* y procedimientos preclínicos y clínicos apropiados, podrán ser de una utilidad extraordinaria en la clínica. Por ejemplo, la generación de neuronas o células musculares a partir de CTH, y viceversa, podrá convertirse en un procedimiento de gran relevancia para el tratamiento de enfermedades neurológicas, autoinmunes y metabólicas, como lo indican los estudios en modelos animales.

Conclusiones

Durante los últimos años, la biología de las células troncales somáticas se ha convertido en un área de gran importancia; por un lado, ha contribuido al estudio de mecanismos básicos

involucrados en la proliferación y la diferenciación celular; por otro lado, ha probado ser esencial para el desarrollo de la terapia celular, campo emergente de la biomedicina de relevancia para el tratamiento de varios trastornos. En este contexto, el estudio de las células troncales embrionarias (CTE) es igualmente importante, ya que se ha probado que estas células poseen un potencial de proliferación y diferenciación extraordinario, tanto *in vivo* como *in vitro* [118-122]. Sin embargo, la gran preocupación que surge cuando se trabaja con CTE en estudios orientados a la clínica, es el aspecto ético asociado con el uso y mal uso de embriones [123]. A este respecto, la investigación con células troncales somáticas tiene una ventaja significativa sobre la investigación con CTE.

Es evidente que la plasticidad demostrada por distintos tipos de células troncales somáticas tanto *in vitro* como *in vivo*, tendrá una gran relevancia clínica en los años venideros. Por ejemplo, un banco de células troncales hematopoyéticas, nerviosas o musculares, expandidas a partir de una reserva de donadores tipificados para el antígeno HLA podrá proporcionar células troncales transplantables para una gran variedad de enfermedades. Aunque es difícil decir cuando se llevarán a cabo los primeros estudios clínicos con células troncales somáticas, una cosa es segura: primero tenemos que aprender a manipularlas con seguridad, lo cual representa una tarea formidable y nada fácil.

La biología de las células troncales no sólo es un campo fascinante en si mismo, sino que la investigación en esta área de la biomedicina debería representar una prioridad en la medicina moderna. Actualmente, millones de personas en el mundo son afectadas por alguna enfermedad que pudiera ser curada por medio de la terapia celular. Sólo en los Estados Unidos, casi 60 millones de personas están afectadas por enfermedades cardiovasculares; 30 millones sufren algún trastorno autoinmune; 16 millones están afectadas por la diabetes; más de 8 millones tiene algún tipo de cáncer y más de 5 millones de personas sufren algún trastorno neurológico como son las enfermedades de Alzheimer o Parkinson [124]. En algunos países en desarrollo estas enfermedades son también problemas de salud importantes. En México, por ejemplo, actualmente las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la diabetes ocupan el primero, segundo y cuarto lugares, entre las causas de muerte en la población en general (de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática; INEGI, México). Por lo tanto, el impacto que la investigación en células troncales tendrá en la medicina en los años por venir es más importante de lo que imaginamos.

Referencias

1. Till, J. E. y McCulloch, E. A. (1961) *Rad. Res.* **14**, 213-222
2. Slack, J. M. W. (2000) *Science* **287**, 1431-1433
3. Gage, F. H. (2000) *Science* **287**, 1433-1438
4. Vogel, G. (1999) *Science* **286**, 2238-2239
5. Till, J. E. y McCulloch, E. A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **605**, 431-459
6. Dexter, T. M. y Spooncer, E. (1987) *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**, 423-441
7. McKay, R. (2000) *Nature* **406**, 361-364
8. Green, H. (1977) *Cell* **11**, 405-415
9. Gordon, M. Y. y Barret, M. J. (1985) *Blackwell Scientific Publications, UK.* p.3
10. Kempermann, G., Kuhn, H. G., y Gage, F. H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **94**, 10409-10414
11. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. D. (1994) *Molecular Biology of the Cell.* 3rd edition. Garland Publishing Inc. New York. p.1037-1137
12. Odorico, J. S., Kaufman, D. S., y Thomson, J. A. (2001) *Stem Cells* **19**, 193-204
13. Williams, R. L. (1988) *Nature* **336**, 685-687
14. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. D. (1994) *Molecular Biology of the Cell.* 3rd edition. Garland Publishing Inc. New York. p.1011-1035
15. Szilvassy, S. J., y Hoffman, R. (1995) *Biol. Blood Marr. Transpl.* **1**, 3-17
16. Thomas, T. E., Miller, C. L., y Eaves, C. J. (1999) *Methods* **17**, 202-218
17. Civin, C. I., y Gore, S. D. (1993) *J. Hamatother* **2**, 137-144

18. Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Livingston, A. G., Flake, A. W., y Ogawa, M. (1998) *Exp. Hematol.* **26**, 353-360
19. Bathia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I., y Dick, J. (1998) *Nat. Med.* **4**, 1038-1045
20. Gallacher, L., Murdoch, B., Wu, D. M., Karanu, F.N., Keeney, M., y Bathia, M. (2000) *Blood* **95**, 2813-2820
21. Spangrude, G.J., Heimfeld, S., y Weissman, I. L. (1988) *Science* **241**, 58
22. Spangrude, G. J., y Johnson, G. R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7433
23. Jordan, C. T., y Lemishka, I. R. (1990) *Genes Dev.* **4**, 1407
24. Kamel-Reid, S., y Dick, J. E. (1988) *Science* **242**, 1706
25. Sutherland, H.J., Lansdorp, P. M., Henkelman, D. H., y Eaves, C. J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3584
26. Lendahl, U., Zimmerman, L. B., y McKay, R. D. (1990) *Cell* **60**, 585-595
27. Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M. M., y McKay, R. D. (1996) *Genes Dev.* **10**, 3129-3140
28. Gage, F. H., Ray, J., y Fisher, L. J. (1995) *Annu. Rev. Neurosci.* **18**, 159-192
29. Gaiano, N., y Fishell, G. (1998) *J. Neurobiol.* **36**, 152-161
30. Fricker, R. A., Carpenter, M. K., Winkler, C., Greco, C., Gates, M. A., y Bjorklund, A. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 5990-6005
31. Auerbach, J. M., Eiden, M. V., y McKay, R. D. G. (2000) *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1696-1704
32. Reynolds, B. A., y Weiss, S. (1992) *Science* **255**, 1707-1710
33. Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M. M., y McKay, R. D. G. (1996) *Genes Dev.* **10**, 3129
34. Lord, B. I., Testa, N. G., y Hendry, J. H. (1975) *Blood* **46**, 65-72
35. Gong, J. K. (1978) *Science* **199**, 1443-1445
36. Nilsson, S. K., Johnston, H. M., y Coverdale, J. A. (2001) *Blood* **97**, 2293-2299
37. Kornack, D. R., y Rakic, P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **96**, 5768-5773
38. Chiasson, B. J., Tropepe, V., Morshead, C. M., y van der Kooy, D. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 4462-4471
39. Pagano, S. F., Impagnatiello, F., Girelli, M., Cova, L., Grioni, E., Onofri, M., Cavallaro, M., Etteri, S., Vitello, F., Giombini, S., Solero, C. L., y Parati, E. A. (2000) *Stem Cells* **18**, 295-300
40. Fuchs, E. (1990) *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 1028-1035
41. Watt, F. M. (1984) *J. Cell. Biol.* **98**, 16-21
42. Horvitz, H. R., y Herskowitz, I. (1992) *Cell* **68**, 237-255
43. Morrison, S. J., Shah, N. M., y Anderson, D. J. (1997) *Cell* **88**, 287-298
44. Suda, T., Suda, J., y Ogawa, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **81**, 2520-2524
45. Leary, A. G., Strauss, L.C., Civin, C. I., y Ogawa, M. (1985) *Blood* **66**, 327-332
46. Mayani, H., Dragowska, W., Lansdorp, P. M. (1993) *J. Cell. Physiol.* **157**, 579-586
47. Brummendorf, T. H., Dragowska, W., Zijlmans, J.M., Thornbury, G., y Lansdorp, P. M. (1998) *J. Exp. Med.* **188**, 1117-1124
48. Chenn, A., y McConnel, S. K. (1995) *Cell* **82**, 631-641
49. Shivdasani, R. A., y Orkin, S. H. (1996) *Blood* **87**, 4025-4039
50. Tenen, D., Hromas, R., y Licht, J. (1997) *Blood* **90**, 489-519
51. Lawrence, H. J., y Largman, C. (1992) *Blood* **80**, 2445-2453
52. Sieweke, M. H., y Graf, T. (1998) *Curr. Op. Gen. Dev.* **8**, 545-551
53. Buske, C., Feuring-Buske, M., Antonchuck, J., Rosten, P., Hogge, D. E., Eaves, C. J., y Humphries, R. K. (2001) *Blood* **97**, 2286-2292
54. Begley, C. G., y Green, A. R. (1999) *Blood* **93**, 2760-2770
55. Morrison, S. J. (2000) *Curr. Op. Cell. Biol.* **13**, 666-672
56. Vaccarino, F. M., Ganat, Y., Zhang, Y., y Zheng, W. (2001) *Neuropsychopharmacology* **25**, 805-815
57. Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J., y Zoghbi, H. Y. (2001) *Science* **294**, 2155-2158
58. Furukawa, Y. (1998) *Human Cell* **11**, 81-92
59. Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y-G., Dombkowski, D., Sykes, M., y Scadden, D.T. (2000) *Science* **287**, 1804-1808
60. Blackburn, E. (1991) *Nature* **350**, 569-573
61. Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B., y Lansdorp, P. M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **91**, 9857-9860
62. Lansdorp, P. M. (1995) *J. Cell. Sci.* **108**, 1-6
63. Morin, G. B. (1989) *Cell* **59**, 521-529
64. Chiu, C-P., Dragowska, W., Kim, N. W., Vaziri, H., Yui, J., Thomas, T.E., Harley, C.B., y Lansdorp, P. M. (1996) *Stem Cells* **14**, 239-248
65. Ostenfeld, T., Caldwell, M. A., Prowse, K. R., Linskens, M. H., Jauniaux, E., y Svendsen, C. N. (2000) *Exp. Neurol.* **164**, 215-226

66. Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D. D., Lesche, R., Trumpp, A., Zack, J. A., Kornblum, H. I., Liu, X., y Wu, H. (2001) *Science* **294**, 2186-2189
67. Mayani, H., Guilbert, L.J., y Janowska-Wieczorek, A. (1992) *Eur. J. Haematol.* **49**, 225-233
68. Taichman, R. S., y Emerson, S. G. (1994) *J. Exp. Med.* **179**, 1677-1682
69. Mayani, H. (1996) *Leukemia* **10**, 1041-1047
70. Torok-Storb, B. (1988) *Blood* **72**, 373-385
71. Murphy, Jr. M. J. (1994) The Metcalf Forum. *AlphaMed Press, Dayton, USA*. p.326
72. Flanagan, J. G., y Leder, P. (1990) *Cell* **63**, 185-194
73. O'Farrel, A-M., Kinoshita, T., y Miyajima, A. (1996) *Blood Cell Biochemistry: Hematopoietic Cell Growth Factors and their Receptors*. Whetton AD, Gordon J, eds. Plenum Press, New York, USA. 1-40
74. Van Zant, G., y Golwasser, E. (1979) *Blood* **53**, 946-952
75. Salvado, A. J., La Russa, V. F., Kessler, S. W., y Wright, D. G. (1988) *Blood* **72** [suppl 1], 101a
76. Metcalf, D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11310-11314
77. Yamada, T., Abe, M., Higashi, T., Yamamoto, H., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T., Shirai, T., y Oikawa, T. (2001) *Blood* **97**, 2300-2307
78. Pharr, P. N., Ogawa, M., Hofbauer, A., y Longmore, G. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **91**, 7482-7486
79. Ogawa, M. (1989) *Environ. Health Perspect.* **80**, 199-207
80. Abkowitz, J. L., Catlin, S. N., y Gutter, P. (1996) *Nat. Med.* **2**, 190-197
81. Davis, A. A., y Temple, S. (1994) *Nature* **372**, 263-266
82. Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., y Weiss, S. (1992) *J. Neurosci.* **12**, 4564-4574
83. Shah, N. M., Groves, A. K., y Anderson, D. J. (1996) *Cell* **85**, 331-343
84. Lo, L., Sommer, L., y Anderson, D. J. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 440-450
85. Brüstle, O., Spiro, A. C., Karrman, K., Choudhary, K., Okabe, S., y McKay, R. D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **94**, 14809-14814
86. Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M., Herrera, D.G., y Alvarez-Buylla, A.. (1999) *Nature Neurosci.* **2**, 461-466
87. Gage, F. H., Coates, P. W., Palmer, T. D., Kuhn, H. G., Fisher, L. J., Suhonen, J. O., Peterson, D. A., Suhr, S. T., y Ray, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **92**, 11879-11883
88. Suhonen, J. O., Peterson, D. A., Ray, J., y Gage, F. H. (1996) *Nature* **383**, 624-627
89. Poznanski, M. C., Olszak, I. T., Foxall, R. B., Piascik, A., Adams, G. B., Evans, R. H., Cheng, T., y Scadden, D. T. (2001) *Exp. Hematol.* **29**, 766-774
90. Rebel, V. I., Miller, C., Eaves, C., y Lansdorp, P.M. (1996) *Blood* **87**, 3500-3507
91. Lansdorp, P.M., Dragowska, W., y Mayani, H. (1993) *J. Exp. Med.* **178**, 787-791
92. Mayani, H., y Lansdorp, P.M. (1998) *Stem Cells* **16**, 153-165
93. Lansdorp, P.M. (1995) *Exp. Hematol.* **23**, 187-191
94. Wulf, G.G., Jackson, K.A., y Goodel, M.A. (2001) *Exp. Hematol.* **29**, 1361-1370
95. Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Colerra, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., y Mavilio, F. (1998) *Science* **279**, 1528-1530
96. Bittner, R. E., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Ivanova, S., Streubel, B., Hauser, E., Freilinger, M., Höger, H., Elbe-Bürger, A., y Wachtler, F. (1999) *Anat. Embryol.* **199**, 391-396
97. Gussoni, E., Soneka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M., y Mulligan, R. C. (1999) *Nature* **401**, 390-394
98. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., y Bodine, D. M. (2001) *Nature* **401**, 701-705
99. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., y Goff, J. P. (1999) *Science* **284**, 1168-1170
100. Alison, M. R., Poulson, R., Jeffrey, R., Dhillon, A. P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J., y Wright, N. A. (2000) *Nature* **406**, 257
101. Theise, N. D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Ille, P. B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O., y Krause, D. S. (2000) *Hepatology* **32**, 11-16
102. Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., y Grompe, M. (2000) *Nat. Med.* **6**, 1229-1234
103. Brazelton, T. R., Rossi, F. M. V., Keshet, G. I., y Blau, H. M. (2000) *Science* **290**, 1775-1779
104. Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., y McKercher, S. R. (2000) *Science* **290**, 1779-1782
105. Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner-Rneutzetel, S., y Sharkis, S. J. (2001) *Cell* **105**, 369-377
106. Rosenberg, S. A. (2001) *The Cancer Journal* **7** (Suppl 2), S51-S52
107. Ball, E. D., Lister, J., y Law, P. (2000) *Churchill-Livingstone, Philadelphia, USA*, p.757
108. Shadduck, R. K., Zeigler, Z. R., Andrews, III D. F., Gilmore, G.L., y Lister, J. (1998) *Stem Cells* **16** (suppl 1), 145-158

109. Gluckman, E. (2000) *Exp. Hematol.* **28**, 1197-1205
110. Douay, L. (2001) *J. Hematother Stem Cell Res.* **10**, 341-346
111. McNiece, I. K. (2001) *J. Hematother Stem Cell Res.* **10**, 431-433
112. Mackin, W., Gunter, K. C., y Kraus, M. (2001) *The Cancer Journal* **7** (suppl 2), S95-S105
113. Flores-Guzmán, P., Gutiérrez-Rodríguez, M., y Mayani, H. (2002) *Arch. Med. Res.* **33**, 107-114
114. Bodine, D. M. (2001) *Hematopoietic stem cell gene therapy: Progress and prospects. In Hematopoiesis. A developmental approach.* Zon LI, ed. Oxford University Press, New York, p.130-146
115. Kohn, D. B., Weinberg, K. I., y Nolte, J. A. (1995) *Nat. Med.* **1**, 1017-1023
116. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., y De Saint Basile, G., (2000) *Science* **288**, 669-672
117. Flake, A. W. (2001) *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **14**, 671-683
118. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., y Shapiro, S. S. (1998) *Science* **282**, 1145-1147
119. Amit, M., Carpenter, M. K., y Inokuma, M.S. (2000) *Dev. Biol.* **227**, 271-278
120. Wakayama, T., Tabar, V., Rodríguez, I., Perry, A.C.F., Studer, L., y Mombaerts, P. (2001) *Science* **292**, 740-743
121. Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., y McKay, R. (2001) *Science* **292**, 1389-1394
122. Lebkowski, J., Gold, J., Xu, C., Funk, W., Chiu, C-P., Carpenter y M. K. (2001) *The Cancer Journal* **7**(suppl 2), S83-S93
123. News Focus (2001) *Science* **293**, 1242-1245
124. Perry, D. (2000) *Science* **287**, 1423

Semblanza del Dr. Héctor Mayani



El Dr. Héctor Mayani Viveros es Biólogo, egresado de la Facultad de Ciencias, UNAM. Realizó estudios de Maestría en Ciencias en Biología Celular (Facultad de Ciencias, UNAM) y de Doctorado en Biomedicina (Facultad de Medicina, Universidad de Alberta, Edmonton, Canadá). Posteriormente, realizó dos estancias postdoctorales en el Laboratorio Terry Fox del Centro de Investigación en Cáncer de Columbia Británica, Vancouver, Canadá y en el Departamento de Hematología del Colegio de Medicina de la Universidad de Gales, Cardiff, Gran Bretaña. Actualmente, el Dr. Mayani es Jefe

de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Por su amplio reconocimiento en el área, a nivel internacional y nacional, el Dr. Mayani ha recibido varios premios y distinciones en los que destacan: la Medalla Gabino Barreda (UNAM); Britannica Society Award; ASH Award (American Society of Hematology); Premio Miguel Alemán en Salud (Fundación Miguel Alemán); Premio Dr. Luis Sánchez Medal (Sociedad Mexicana de Hematología); y Premio Latinoamericano en Oncología Aguilla Saude. Pertenece a Investigador Titular D (IMSS) y al Sistema Nacional de Investigadores Nivel 3. En investigación el Dr. Mayani ha publicado 72 artículos en revistas internacionales (con factor de impacto mayor a 1.0) y 16 artículos en revistas nacionales; tiene más de 1,700 citas de los trabajos publicados. Ha escrito tres capítulos en libros internacionales y dos en libros nacionales. A nivel docencia, el Dr. Mayani ha dirigido alumnos de posgrado de los cuales 9 alumnos de Doctorado y 5 alumnos de Maestría están graduados. Las líneas de Investigación del Dr. Mayani son: Células Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas; Enfermedades del Sistema Hematopoyético; Células Troncales Mesenquimales; Cáncer; y Terapia Celular. Tiene una amplia experiencia profesional; lleva 24 años trabajando en el estudio de la Hematopoyesis y 9 años trabajando en el estudio de las células troncales mesenquimales. Su investigación es financiada por: Coordinación de Investigación en Salud (IMSS), CONACYT, Fundación Miguel Alemán, Academia de Ciencias del Tercer Mundo (TWAS) y Fundación Terry Fox (CANADA).



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS EN *Escherichia coli* PTS- PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS SOBREPDUCTORAS DE SHIKIMATO

Adelfo Escalante, Araceli Valdivia, Guillermo Gosset y Francisco Bolívar
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001. Col Chamilpa. Cuernavaca Morelos. 62210. México
adelfo@ibt.unam.mx

Resumen

La vía del shikimato, es la ruta común para la biosíntesis de compuestos aromáticos en bacterias y plantas principalmente. El primer paso de la vía es la condensación del fosfoenolpiruvato y de la eritrosa-4-fosfato, por la enzima 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato (DAHP) sintasa (DAHPS), para rendir DAHP, el cual es transformado subsecuentemente hasta corismato. El shikimato, es un intermediario clave de esta vía, ya que recientemente ha sido utilizado como el precursor para la síntesis química del compuesto oseltamivir-fosfato, conocido comercialmente como Tamiflu®, un antiviral de aplicación oral utilizado para el tratamiento de la gripe aviar que infecta a humanos y que es causada por el virus de gripe aviar H5N1. E. coli ha sido utilizada como sistema modelo para la sobreproducción de diversos metabolitos y proteínas recombinantes de interés comercial. Ante la posible necesidad a escala regional o global del antiviral Tamiflu®, en caso de una pandemia de gripe aviar, diferentes grupos de investigación han aplicado diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas para la sobreproducción de este compuesto en diferentes cepas de E. coli. En este trabajo se describen las principales aproximaciones de ingeniería de vías metabólicas sobre el metabolismo central de carbono y la vía del shikimato aplicadas en E. coli, para la obtención de cepas sobreproductoras de shikimato.

Palabras clave: Ingeniería de vías metabólicas, *Escherichia coli*, shikimato, gripe aviar.

Abstract

Shikimic acid pathway is the common pathway for the biosynthesis of aromatic compounds. The first step in this pathway is the condensation of the glycolytic intermediate phosphoenol pyruvate and the pentose phosphate pathway intermediate erythrose 4-phosphate by the enzyme 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase (DAHPS), into DAHP. This product is then subsequently transformed to chorismate. Shikimic acid is a key intermediate of this pathway. It has been used as raw material for the chemical synthesis of the neuraminidase enzyme inhibitor known as oseltamivir phosphate. This compound is distributed commercially as Tamiflu®, and is an effective oral anti-viral drug for the treatment of the avian influenza virus type H5N1 that currently threatens as a new pandemic. Escherichia coli has been used as a model for the overproduction of several microbial metabolites and recombinant proteins with important commercial and biotechnological implications. Potential risk of an avian flu pandemic, demands to achieve an important stock of shikimic acid for the production of Tamiflu® at local and global scales. As consequence, several metabolic engineering strategies have been applied for the overproduction of shikimic acid in several laboratory E. coli strains. This work describes the main metabolic engineering strategies applied to modify the central carbon metabolism and shikimic acid pathway in E. coli to construct overproducing shikimic acid derivatives.

Keywords: Metabolic engineering, *Escherichia coli*, shikimic acid, avian flu.

Introducción

Escherichia coli y muchos otros microorganismos sintetizan metabolitos aromáticos a partir de la vía del shikimato (VSHK), que inicia con la reacción de condensación del fosfoenolpiruvato (PEP) y de la eritrosa-4-P (E4P), intermediarios de la glicólisis y de la vía de las pentosas, respectivamente, para formar 3-deoxi-D-*arabinoheptulosonato* 7-fosfato (DAHP). Esta primera reacción de la VSHK, es catalizada en *E. coli* por cada una de las tres isoformas de la enzima DAHP sintasa (DAHPS), AroF, AroG y AroH, codificadas por los genes *aroG*, *aroF* y *aroH*, respectivamente. Estos genes están sujetos a control transcripcional y alostérico por la fenilalanina, tirosina y triptofano, respectivamente. El DAHP es convertido a 3-dehidroquinato (DHQ), por acción de la enzima 3-DHQ sintasa, codificada por el gen *aroB*. El DHQ es deshidratado para rendir 3-dehidroshikimato (DHS) por acción de la enzima 3-DHQ deshidratasa, codificada por el gen *aroD*. El DHS es reducido a shikimato (SHK) con el consumo de NADH por la enzima SHK deshidrogenasa, codificada por la enzima *aroE*. El SHK es convertido a shikimato-3-P (S3P), por las enzimas Shikimato cinasa I y II, codificadas respectivamente por los genes *aroK* y *aroL*. El S3P es convertido a 5-enolpiruvilshikimato-3-P (EPSP), por la enzima 5-EPSP sintasa, codificada por el gen *aroA*. Este último intermediario es convertido a corismato por la enzima Corismato sintasa, codificada por el gen *aroC*. El corismato es un precursor común para la síntesis de metabolitos aromáticos primarios y de diversos metabolitos aromáticos secundarios (Figura 1). La VSHK esta presente en bacterias, plantas y en algunos otros organismos eucariontes como hongos ascomicetos y en organismos de grupo de los apicomplexa (protistas parásitos patogénicos) [1,2].

En *E. coli* las enzimas DHQ sintasa, DHQ deshidratasa y la SHK deshidrogenasa son expresadas constitutivamente en contraste con la regulación transcripcional de las isoenzimas DAHPS AroG, AroF y AroH, mientras que se presenta un mecanismo de inhibición por acumulación de producto a nivel de la SHK deshidrogenasa por SHK. Se han identificado también como reacciones limitantes de la vía a las catalizadas por las enzimas SHK deshidrogenasa (*aroB*) y SHK cinasa (*aroL* o *aroK*) [1].

Algunos de los intermediarios y productos finales de la VSHK poseen gran importancia desde el punto de vista biotecnológico, debido a su importancia comercial, de ellos destacan los aminoácidos aromáticos triptofano y fenilalanina, los cuales son utilizados directamente como complementos alimenticios o bien como materia prima para la síntesis de edulcorantes o saborizantes, de los que destaca el aspartame; o por su uso como materia prima para la síntesis de compuestos químicos de valor agregado como antranilato, catecol o melanina [3]. El intermediario SHK es utilizado como materia prima para la síntesis de una gran cantidad de compuestos químicos de valor agregado como diversos antibióticos, alcaloides, herbicidas y para la producción de fenol [1,2,4,5]. Recientemente, este intermediario ha tenido una mayor atención ya que es utilizado como materia prima para la síntesis química del inhibidor de la enzima neuraminidasa de virus de gripe. Este compuesto conocido con el nombre comercial de Tamiflu® fue desarrollado por Roche Pharmaceuticals como un agente antiviral oral para el tratamiento de gripe aviar de tipo H5N1, el cual actualmente representa una amenaza de una pandemia [6].

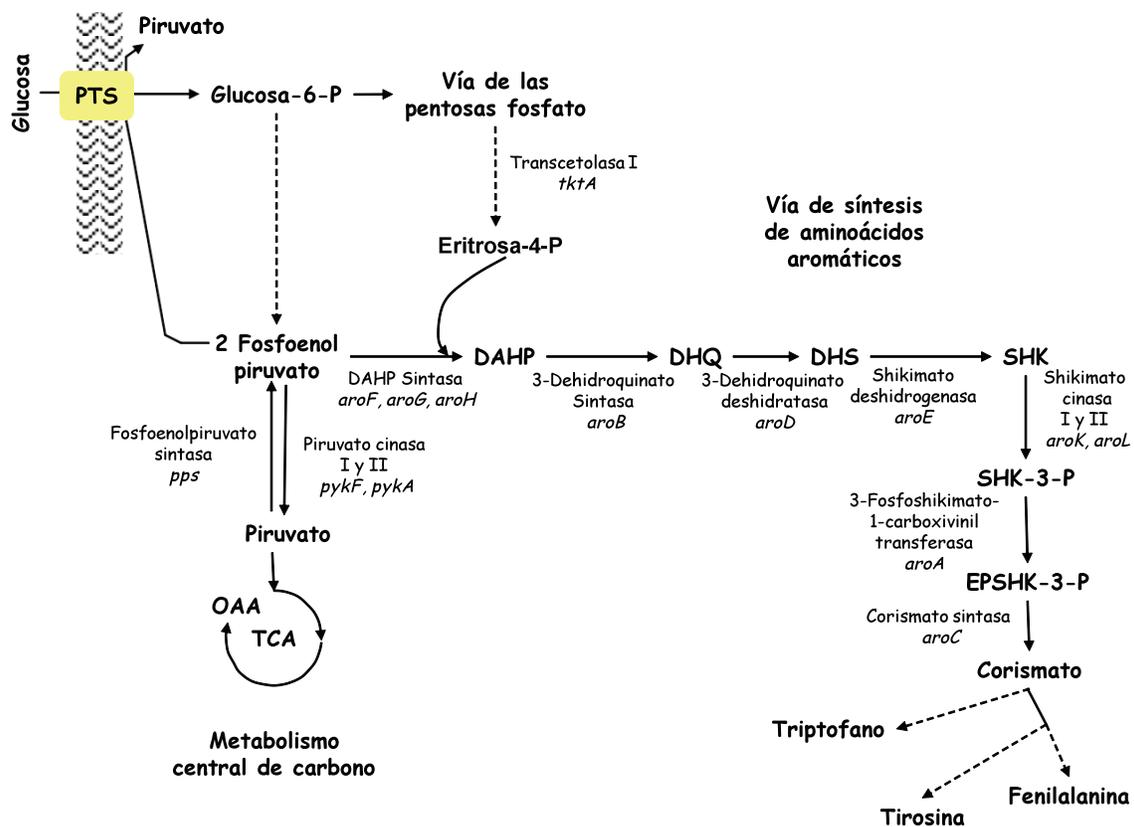


Figura 1. Metabolismo central de carbono y vía de síntesis de compuestos aromáticos en *E. coli*: PTS, Sistema de fostransferasa de glucosa dependiente de fosfoenolpiruvato; TCA, Ciclo de los ácidos tricarbóxicos; OAA, Oxaloacetato; DAHP, 3-deoxi-D-*arabino*heptuloseonato-7-P; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidroshikimato; SHK, shikimato; SHK-3P, shikimato-3-P; EPSHK-3-P, 5-enolpiruvil-shikimato-3-P. Las líneas continuas representan una sola reacción enzimática independientemente de si es catalizada por una enzima o más isoenzimas. Las líneas punteadas representan dos o más reacciones. Se muestran las enzimas participantes en varias de las reacciones de relevancia y los genes que las codifican.

A partir de 1999, Roche incrementó su producción de Tamiflu® para asegurar una reserva importante de este compuesto en varios países desarrollados en previsión de una posible pandemia de gripe aviar, sin embargo, se ha estimado que en caso de presentarse un escenario pandémico la producción de Tamiflu® por esta compañía es insuficiente para atender la población de países en vías de desarrollo [7,8]. Ante esta situación, es importante contar con capacidades locales y regionales para producir este compuesto antiviral y otras moléculas antivirales de nueva generación por medio de aproximaciones biotecnológicas con cepas bacterianas mejoradas genéticamente. Con este fin, se han aplicado diversas estrategias dentro del área de investigación denominada como ingeniería de vías metabólicas (IVM), y que se puede definir como la modificación directa de las propiedades celulares a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o la introducción de otras nuevas, por medio del uso de la tecnología del ADN recombinante [9]. Para el caso del shikimato, se refiere a modificaciones en genes específicos del metabolismo central de carbono y metabolismo de compuestos aromáticos en *E. coli*.

Ingeniería de vías metabólicas para la producción de metabolitos de interés en *E. coli*.

Las estrategias a considerar para incrementar la producción de un metabolito de interés en el contexto de la IVM son: (i) incremento de la disponibilidad de la fuente de carbono utilizada como sustrato para la obtención de precursores utilizados para la biosíntesis de productos de interés; (ii) incremento en la disponibilidad de los intermediarios obtenidos del catabolismo de la fuente de carbono, a través del metabolismo central de carbono; (iii) mejoramiento de la reacción que cataliza la canalización de los intermediarios del metabolismo central de carbono (MCC), a la vía de interés; (iv) eliminación de los mecanismos de control transcripcional y alostérico de la vía; (v) identificación y eliminación de reacciones limitantes de la vía; y (vi) prevención de la pérdida de carbono hacia otras vías [3]. En este contexto, algunas de las estrategias aplicadas para la obtención de cepas sobreproductoras de metabolitos aromáticos en *E. coli* son:

- a. Inactivación del sistema de transporte de glucosa dependiente de fosfotransferasa y fosfoenolpiruvato (PTS:glucosa:PEP). *E. coli* internaliza la glucosa del medio extracelular al periplasma por los sistemas de transporte inespecíficos OmpC (Porina de membrana externa C), OmpF (Porina de membrana externa F) y LamB (Proteína receptora del fago Lambda; receptor de maltosa de alta afinidad). Una vez en el periplasma, la glucosa es introducida preferencialmente por el sistema de PTS:glucosa:PEP (Figura 2). Este sistema esta formado por tres componentes citoplasmáticos (EI, Hpr y IIA, codificados en un operón por los genes *ptsH*, *ptsI* y *crr*, respectivamente) y un componente de membrana (conformado por IIB^{gluc} y IIC^{gluc}). Durante el transporte de glucosa por este sistema, un grupo fosfato proveniente del PEP es acarreado por los componentes EI→Hpr→IIA→IIB^{gluc} para fosforilar a la glucosa entrante y rendir Glucosa-6-P. La glucosa también puede ser introducida del periplasma al citoplasma por los sistemas de transporte de galactosa MFS GalP (Permeasa de galactosa) y MglABC (Transportador ABC de galactosa) [3,10].

La inactivación del sistema PTS:glucosa:PEP (Figura 2) en *E. coli*, evita que una molécula de PEP proveniente del catabolismo de glucosa sea utilizada por este sistema para transportar y fosforilar a este azúcar durante su transporte y como resultado, la célula puede disponer de dos moléculas de PEP. Como resultado de esta modificación en la cepa silvestre de *E. coli* JM101, se obtuvo la cepa PTS⁻ glucosa denominada como PB11 (JM101 Δ (*ptsH crr ptsI*):kan), que ve afectada de forma muy importante su capacidad de crecimiento como consecuencia de esta mutación [11,12]. A partir de un cultivo continuo de esta cepa en medio mineral mínimo con glucosa como fuente de carbono se obtuvieron cepas derivadas que seleccionaron diversas mutaciones que les permitieron asimilar la glucosa del medio y crecer a velocidades mayores que la cepa progenitora PB11 (PTS⁻ glc⁻), pero a una velocidad específica de crecimiento menor que la cepa silvestre (Figura 2). Una de estas cepas derivadas que fue denominada como PB12 (PTS⁻ glc⁺), seleccionó el sistema de transporte de galactosa (GalP), para internalizar la glucosa del periplasma y

fosforilarla por medio de la enzima glucocinasa (Glc y codificada por el gen *glk*), nativa de la bacteria. La cepa PB12 y sus progenitoras PB11 y JM101 han sido estudiadas utilizando diferentes aproximaciones de la biología de sistemas. El análisis por resonancia magnética nuclear de estas cepas determinó una modificación en la distribución de los flujos de carbono en varios nodos (o puntos de unión de varias vías metabólicas) y porciones del metabolismo central de carbono. Así por ejemplo, se determinó que en la cepa PB12, el flujo de carbono se incrementó a 95% respecto a la cepa silvestre JM101 (77%) y a la cepa PB11 (42%). El análisis transcriptómico por PCR en tiempo real (RT-PCR), de los genes del metabolismo central de carbono en estas cepas demostró, por ejemplo, un incremento en el nivel de expresión de *galP* (12.4X para la cepa PB11 y 13.1X para la PB12), *mgIB* (componente del transportador ABC MglB de galactosa, 13.4X para la PB11 y 9.0X para la PB12), mientras que se observaron también incrementos importantes en los genes *tktA*, (involucrado en la síntesis de E4P, 2.9X) y *aroG* (0.7X) en cepa PB12, respecto a la silvestre JM101 [13-15].

- b. Incremento de la disponibilidad de E4P como resultado de la incorporación de una copia adicional del gene *tktA*, que codifica para la enzima transcetolasa I. Esta modificación, junto con la descrita en el punto anterior, permiten una mayor disponibilidad los intermediarios PEP y E4, provenientes de la glucólisis y de la vía de las pentosas fosfato, respectivamente, y que pueden ser para la síntesis de DAHP, el primer intermediario en la VSHK [1,4,16-20].
- c. Clonación y transformación del gen que codifica para una versión insensible a inhibición alostérica de la enzima DAHPS AroG (*aroG^{fbr}*, *feedback resistant*), primera reacción de la VSHK. La DAHPS AroG posee la actividad más importante de las tres isoenzimas, que catalizan esta reacción. El incremento de la disponibilidad de los intermediarios PEP y E4P no es suficiente para asegurar a su vez, un incremento en la síntesis de DAHP a través de la reacción catalizada en *E. coli* por las isoenzimas AroF, AroG y AroH (DAHPS). Para este fin, es fundamental la amplificación y eliminación de los mecanismos de control genético y/o de los mecanismos de control de la actividad de la reacción catalizada por alguna de estas isoenzimas. La obtención de una DAHPS AroG^{fbr} (*aroG^{fbr}*), su clonación en un vector de mediano a alto número de copias y la subsiguiente transformación en la cepa PB12 (PTS⁻ glc⁺), tiene como resultado el incremento en el número de copias y en la transcripción del gen *aroG^{fbr}*, lo que a su vez incrementa de forma importante el flujo de carbono del metabolismo central a la VSHK para síntesis de compuestos aromáticos. Por otro lado, la naturaleza fbr de la esta DAHPS AroG, evita también la inhibición de la actividad de la enzima por la fenilalanina (su efector alostérico), producida por la célula o bien por la presencia de este aminoácido como parte de los componentes del medio de cultivo [1, 3]. La aplicación de estas modificaciones a la cepa PB12 junto con otras modificaciones específicas para cada caso, han permitido la obtención de cepas productoras de fenilalanina [16], tirosina [21] y recientemente de shikimato [22].

Obtención de una cepa de *E. coli* PTS⁻glc⁺ sobreproductora de shikimato por ingeniería de vías metabólicas.

Diversos grupos de investigación han desarrollado diferentes estrategias de IVM en *E. coli* para sobreproducir SHK en cultivos en sistemas de fermentación utilizando como fuente de carbono glucosa, como una alternativa al proceso tradicional de extracción a partir de plantas del anís estrella chino *Illicium anisatum* o *I. verum*. Las principales aproximaciones incluyen la canalización de carbono para incrementar la disponibilidad de precursores; interrupción de la VSHK por inactivación de los genes *aroK* y *aroL* (que codifican para las enzimas Shikimato cinasa I y II, respectivamente); y la inactivación del gen *shiA* que codifica para un transportador de SHK [1,5,23].

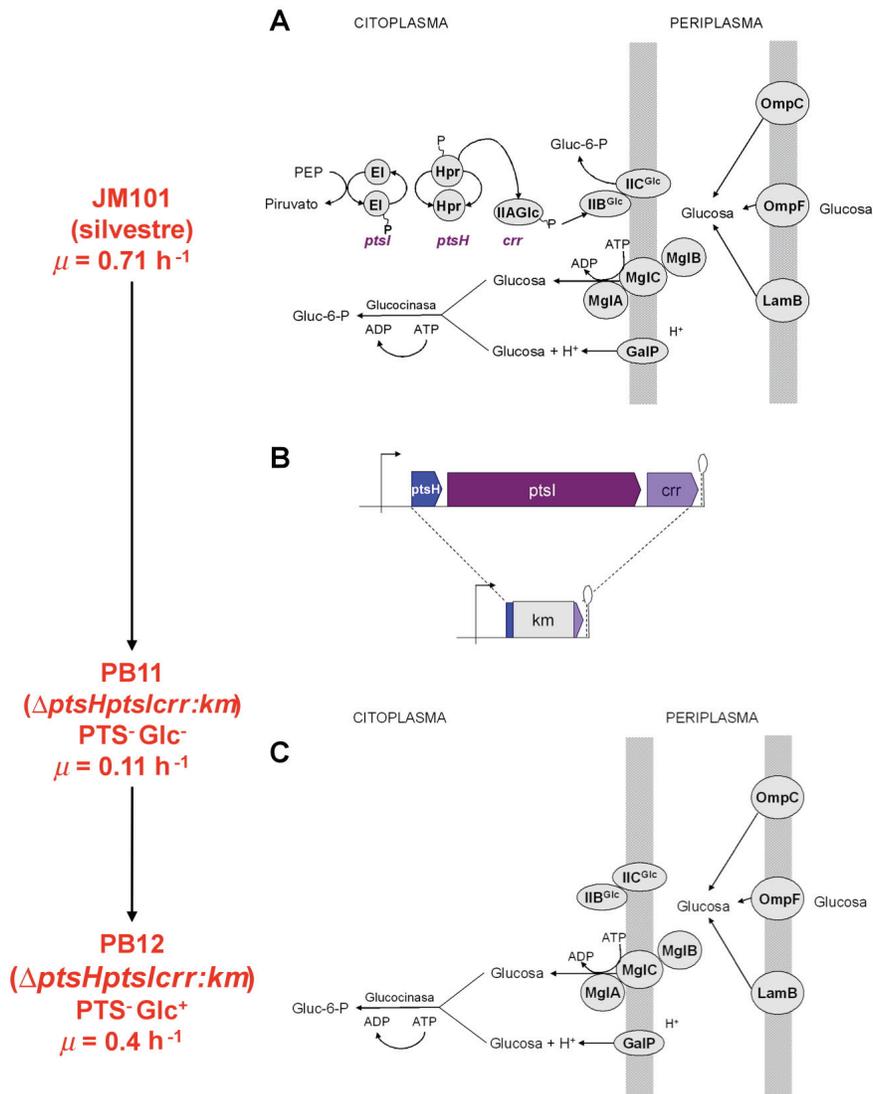


Figura 2. Sistemas de transporte de glucosa en *Escherichia coli* e inactivación del sistema PTS en la cepa JM101. **A.** Sistemas de transporte de glucosa en *E. coli*: OmpC (Porina de membrana externa C), OmpF (Porina de membrana externa F) y LamB (Proteína receptora del fago Lambda; receptor de maltosa de alta afinidad); Fosfotransferasa de glucosa dependiente de fosfoenolpiruvato (se muestra cada uno de los componentes de este sistema); Sistemas de transporte de galactosa MFS GalP (Permeasa de galactosa) y MglABC (Transportador ABC de galactosa). **B.** En la cepa silvestre de *E. coli* JM101 (PTS⁺ Glc⁺, velocidad específica de crecimiento o $\mu = 0.7 \text{ h}^{-1}$ en un medio mineral con glucosa como fuente de carbono o M9), el operón PTS (conformado por los genes *ptsH*, *ptsI*, *crr*), fue inactivado por inserción de un casete de kanamicina, resultando en la cepa PB11 (PTS⁻ Glc⁻). Esta cepa desarrolló de forma espontánea la capacidad de asimilar la glucosa por medio del sistema GalP con una capacidad muy limitada de crecer en medio M9 ($\mu = 0.11 \text{ h}^{-1}$). **C.** A partir de la cepa PB11 se derivó la cepa PB12 (PTS⁻ Glc⁺), la cual es capaz de crecer a una mayor velocidad que su cepa parental PB11 ($\mu = 0.4 \text{ h}^{-1}$) utilizando también el sistema GalP para transportar la glucosa. Ambas cepas fosforilan la glucosa introducida al citoplasma por medio de la enzima nativa Glucocinasa generando Glucosa-6-P.

La canalización de precursores se ha logrado al incrementar la disponibilidad de los intermediarios del metabolismo central de carbono PEP y E4P. El incremento en la disponibilidad de PEP se ha logrado por dos aproximaciones: por inactivación del sistema PTS:glucosa:PEP o reciclando el piruvato como resultado de la sobre expresión del gen *ppsA* que codifica para la enzima Fosfoenolpiruvato sintasa [1,2,11]. Sin embargo, como se describe en la sección anterior, la inactivación del sistema PTS:glucosa:PEP tiene como consecuencia varios efectos adversos sobre la fisiología celular por su importante papel, no sólo en el transporte de glucosa y la capacidad de crecer en medios con este azúcar como fuente de carbono sino por su participación en procesos de regulación globales [11,14].

Para contener con esta consecuencia fisiológica adversa, diversos autores han mejorado la disponibilidad de glucosa mediante la introducción del Facilitador de glucosa y la enzima Glucocinasa de *Zymomonas mobilis* (codificados por los genes *glf* y *glk*, respectivamente) [1,2,17]. La inactivación del sistema PTS:glucosa:PEP en la cepa de *E. coli* JM101 y el cultivo en quimiostato de la cepa derivada PB11 PTS⁻ glc⁻, permitió seleccionar a GalP para transportar a la glucosa, la cual es posteriormente fosforilada por la Glucocinasa [11, 14]. La inactivación del sistema PTS en la cepa de silvestre de *E. coli* W3110 y la introducción de un promotor fuerte como el *trc* para modular la sobre expresión del gen *galP* [24], ha permitido obtener otra alternativa para incrementar el transporte de glucosa y con ello asegurar la disponibilidad de PEP en cepas PTS⁻, el cual puede ser entonces canalizado hacia la VSHK. La disponibilidad de E4P ha sido asegurada por la introducción de una copia adicional del gen *tktA* (como se describió previamente). La canalización de PEP y E4P hacia la VSHK se ha asegurado como resultado de la introducción de una copia adicional del gen *aroF*^{fbr} o *aroG*^{fbr}. La importancia biológica del carácter fbr de las isoenzimas DAPHS AroF o AroG se describió previamente. La introducción de una copia adicional de los genes *tktA* y *aroG*^{fbr} en plásmido tiene como resultado un incremento muy importante en el nivel de transcripción de estos genes. Para el caso de la cepa PB12 se observó un incremento en el nivel de transcripción por RT-PCR en el gen *tktA* de 162.6X y para *aroG*^{fbr} 10.6X, respecto al nivel de transcripción observado en la cepa silvestre JM101 [15].

En la VSHK los genes *aroK* y *aroL*, que codifican para las enzimas Shikimato cinasa I y II, respectivamente han sido inactivados teniendo como resultado la interrupción de la vía en este punto y la acumulación extracelular de SHK (Figura 3) [1,2]. Sin embargo, se ha observado que la acumulación de SHK (hasta 27 g/L), causa un incremento en la concentración de DHS (4.4 g/L) y ácido quínico (AQ, 12.6 g/L), lo que representa un problema importante en la producción de SHK ya que el proceso de purificación y cristalización se ve afectado por estas impurezas. Se ha determinado que la formación de los subproductos DHS y AQ se da a partir de SHK como consecuencia de la reversibilidad de la reacción SHK \leftrightarrow DHS para posteriormente, a partir de DHS formar AQ. La estrategia utilizada para evitar la acumulación de intermediarios aromáticos no deseados ha sido la introducción de una copia adicional del gen *aroE* (que codifica para enzima Shikimato deshidrogenasa), de esta manera la reversibilidad de la reacción SHK \leftrightarrow DHS se ve alterada, favoreciendo la disminución en la formación de los subproductos DHS y AQ. Las mutantes derivadas de la cepa de *E. coli* TP2811 con las modificaciones descritas hasta este punto han permitido la producción de hasta 71 g/L de SHK (rendimiento de 21% (mol SHK/mol glucosa)). En cultivos en fermentador lote-alimentado de 1 L y escalando el proceso a un volumen de fermentación de 10 L, se ha incrementado la producción a 84 g/L de SHK con un rendimiento de 33% (mol SHK/mol glucosa) [2].

Las cepas de *E. coli* PB12 y VH33 (ambas PTS⁻ glc⁺), han sido utilizadas también para la obtención de cepas sobreproductoras de shikimato. La introducción de una copia adicional de los genes *tktA* y *aroG*^{fbr} (en el plásmido pJLB/*aroG*^{fbr} *tktA*), aseguran la disponibilidad de la E4P, uno de los dos sustratos de la enzima DAHPS, que junto con el PEP, son condensados a DAHP, primer intermediario de la vía. La naturaleza insensible a inhibición por producto final (fbr), de la enzima AroG, evita la posibilidad de que esta reacción pueda ser inhibida alostéricamente por la acumulación o presencia de fenilalanina en el medio. La inactivación de los genes que codifican

para las isoenzimas Shikimato cinasa I y II, codificadas respectivamente por los genes *aroK* y *aroL* tiene como resultado la acumulación de shikimato al evitar que sea canalizado hacia la síntesis de corismato. La introducción de una copia adicional de la enzimas 3-DHQ sintasa y SHK deshidrogenasa, enzimas identificadas como limitantes en las reacciones de conversión DAHP ↔ DHQ y DHS ↔ SHK, codificadas respectivamente por los genes *aroB* y *aroE*, evitan la limitación en el flujo de carbono de DAHP a shikimato, asegurando de este modo su acumulación en el medio de cultivo (Figura 4). De estas cepas, la derivada de la PB12 ha sido la mejor cepa sobreproductora, alcanzando poco más de 7 g/L de shikimato con un rendimiento de 0.28 g SHK/g glucosa en cultivos de 1 L en fermentador, utilizando un medio mineral suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura. Es importante considerar que el rendimiento de esta cepa es ligeramente superior al mejor valor reportado en la literatura para cepas productoras de shikimato [16], mientras que la cepa derivada de la VH33 sólo es capaz de producir poco más de 5 g/L [22].

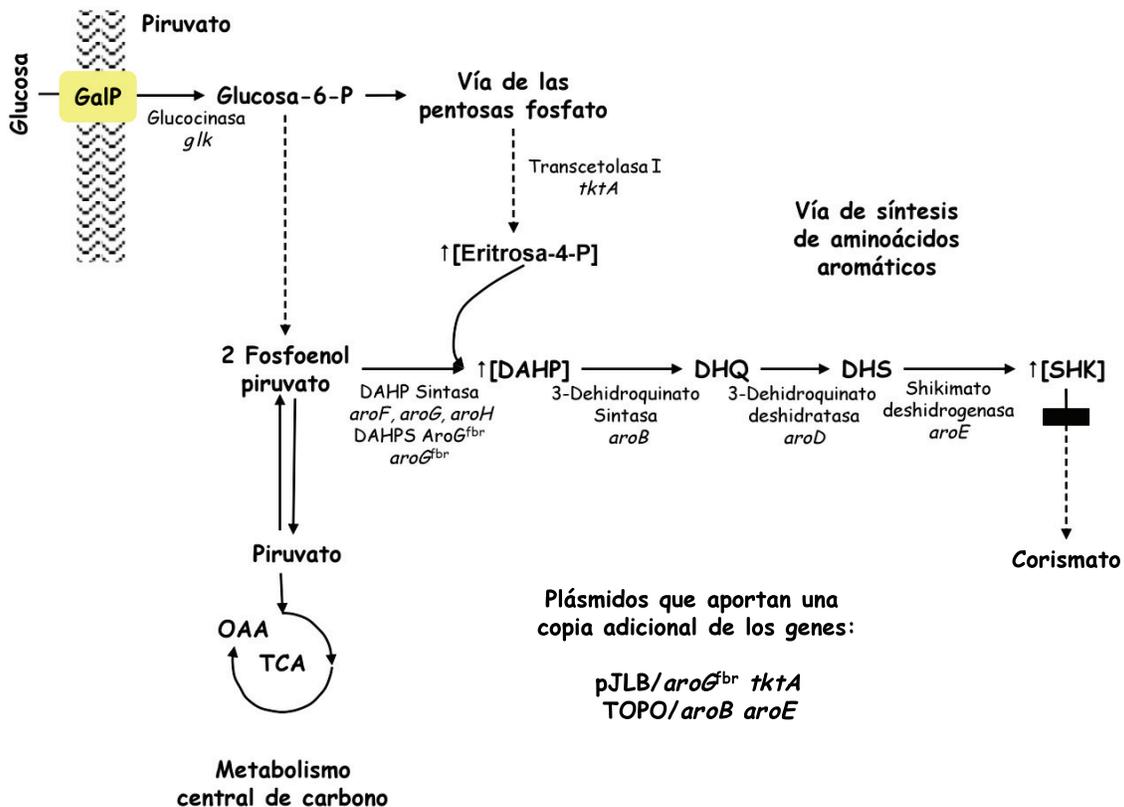


Figura 3. Ingeniería de vías metabólicas en el metabolismo central de carbono y vía del shikimato en cepas de *E. coli* $PTS^- glc^+$ para la sobreproducción de shikimato. GalP, Permeasa de galactosa; TCA, Ciclo de los ácidos tricarboxílicos; OAA, Oxaloacetato; DAHP, 3-deoxi-D-*arabino*heptulose-7-P; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidroshikimato; SHK, shikimato, ^{fbr}, versión insensible a inhibición alostérica; ■, inactivación del gen correspondiente; ↑[], incremento en la concentración del intermediario indicado. Las líneas continuas representan una sola reacción enzimática independientemente de si es catalizada por una enzima o por dos o más isoenzimas. Las líneas punteadas representan dos o más reacciones. Se muestran las enzimas participantes en varias de las reacciones de relevancia y los genes que las codifican.

Referencias

1. Krämer, M., Bongaerts, J., Bovenberg, R., Kremer, S., Müller, U., Orf, S., Wubbolts, M. y Raeven, L. (2003). *Metab. Eng.* 5, 277–283.
2. Richards, T. A., Dacks, J. B., Campbell, S. A., Blanchard, J. L., Foster, P. G., McLeod, R. y Roberts, C. W. (2006). *Eukariot. Cell* 5, 517-1531.
3. Gosset, G. (2005) *Microb. Cell Fac.* 4, 14.
4. Chandran, S. S., Yi, J., Draths, K.M., von Daeniken, R., Weber, W. y Frost J. W. (2003). *Biotechnol. Progr.* 19, 808-804.
5. Adachi, O., Ano, Y., Toyama, H. y Matsushita, K. (2006). *Biosci. Biothec. Bioch.* 70, 2579-2582.
6. Russell, R. J., Haire, L. F., Stevens, D. J., Collins, P. J., Yi Pu Lin, Y. P., Blackburn, G. M., Hay, A. J., Gamblin, S. J. y Skehel, J. J. (2006). *Nature.* 443, 45-49.
7. Abbot, A. (2005). *Nature.* 435, 407-409.
8. Luo, M. (2006). *Nature.* 443, 37-38.
9. Stephanopoulos, G. (1999) *Metab. Eng.* 1, 1-11.
10. Jahreis, K., Pimentel-Schmitt, E. P. , Brückner, R. y Titgemeyer, F. (2008). *FEMS Microbiol Rev.* 32, 891–907.
11. Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolívar, F. y Valle F. (1996) *Nat Biotechnol.* 14, 620–623.
12. Flores, N., Leal, L., Sigala, J.C., de Anda, R., Escalante, A., Martínez, A., Ramírez, O.T., Gosset, G. y Bolívar, F. (2007). *J. Mol Microbiol. Biotechnol.* 13, 105-116.
13. Flores, S., Gosset, G., Flores, N., de Graaf, A. A. y Bolívar, F. (2002). *Metab. Eng.* 4, 124-137.
14. Flores, N., Flores, S., Escalante, A., de Anda, R., Leal, L., Malpica, R., Geogellis, D., Gosset, G. y Bolívar, F. (2005). *Metab. Eng.* 7, 70–87.
15. Báez-Viveros, J. L., Flores, N., Juárez, K., Castillo-España, P., Bolívar, F. y Gosset, G. (2007). *Microb. Cell Fac.* 6, 30.
16. Báez, J.L., Bolívar, F. y Gosset, G. (2001). *Biotechnol. Bioeng.* 73, 530–535.
17. Yi, J., Li, K., Draths, M. y Frost, J. W. (2002). *Biotechnol. Progr.* 18, 1141-1148.
18. Báez-Viveros, J. L., Osuna, J., Hernández-Chávez, G., Soberón, X., Bolívar, F. y Gosset, G. (2004). *Biotechnol. Bioeng.* 87, 516–524.
19. Sabido, A. (2006). Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
20. Martínez, K., de Anda, R., Hernandez, G., Escalante, A., Gosset, G., Ramírez, O. T. y Bolívar, F. G. (2008). *Microb Cell Fac.* 7, 1.
21. Chávez-Bejar, M. I., Lara, A. R., López, H., Hernández-Chávez, G., Martínez, A., Ramírez, O.T., Bolívar, F. y Gosset G. (2008). *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3284-3290.
22. Escalante, A., Calderón, R. V., Valdivia, A., de Anda, R., Hernández, G., Gosset, G. y Bolívar, F. (2009). En preparación.
23. Draths, K. M., Knop, D. R. y Frost, J. W. (1999). *J. Am. Chem. Soc.* 121:1603-1604.
24. Hernández-Montalvo, V., Martínez, A., Hernández-Chávez, G., Bolívar, F., Valle, F. y Gosset, G. (2003). *Biotechnol. Bioeng.* 83, 687–694.

Semblanza del Dr. Adelfo Escalante



El Dr. Adelfo Escalante es Biólogo egresado de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y cursó los estudios de Maestría y Doctorado en Biotecnología en la Facultad de Química, UNAM. Realizó una estancia posdoctoral en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, del Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM, para posteriormente ingresar como Investigador Asociado al grupo de investigación del Dr. Francisco Bolívar-Zapata. Actualmente se desempeña como Investigador Titular dentro de este grupo de trabajo. Las líneas de investigación en las que se desempeña en la actualidad son:

ingeniería de vías metabólicas en cepas de *Escherichia coli* para la sobreproducción de metabolitos aromáticos y el análisis de diversidad microbiana y metabólica a partir de muestras metagenómicas ambientales enfocado a la búsqueda de genes y microorganismos de interés industrial. Se desempeña también como tutor del posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM (sede IBT) y del posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.



Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, (eds). **Mensaje Bioquímico**, Vol XXXIII. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO (2009). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN ENTRE ESTRUCTURAS CONSERVADAS DE *Staphylococcus aureus* Y RECEPTORES CELULARES

Víctor Manuel Baizabal Aguirre¹, Javier Oviedo Boyso¹, Juan José Valdez Alarcón¹, Alejandro Bravo Patiño¹ y Marcos Cajero Juárez²

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia e ²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Posta Veterinaria, Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, 58893, Morelia, Michoacán
baizabal@umich.mx

Resumen

El contacto inicial entre bacterias patógenas y células del hospedero involucra la participación de efectores de virulencia secretados o presentes como estructuras de la pared celular de la bacteria y de proteínas con función de receptor, localizadas en el citoplasma y en la membrana plasmática de las células. Esta interacción tiene como consecuencia que los procesos moleculares de la célula hospedera se modifiquen, de tal forma que se promueva/inhiba la endocitosis del patógeno o bien que el patógeno logre sobrevivir en el espacio intracelular. Uno de los patógenos del humano y animales más versátiles es Staphylococcus aureus. Esta bacteria Gram-positiva contiene en su genoma un conjunto de genes que codifican para efectores de virulencia potenciales. Además, su pared celular está constituida por estructuras químicas complejas que funcionan también como efectores y que son capaces de unirse a ciertos receptores y modificar el comportamiento de las moléculas participantes en vías de transducción de señales. En mi laboratorio nos hemos interesado en estudiar la posible conexión molecular entre la actividad del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y la endocitosis de S. aureus por células endoteliales (CE). Nuestros resultados indican que la vía de señalización activada por la unión de TNF- α con su receptor TNFR1, incrementa no sólo la capacidad endocítica de las CE por S. aureus sino también su potencia para matar la bacteria localizada en el citoplasma. Datos recientes indican que la proteína A (SpA), un efector de virulencia de la pared celular de S. aureus, causa una marcada disminución en la capacidad endocítica de las CE. Actualmente, estamos intentando explicar el mecanismo por el cual TNF- α y SpA, moléculas que se unen al mismo receptor TNFR1, activan una respuesta endocítica por

S. aureus opuesta, con el fin de establecer la contribución de SpA en la patogénesis de esta bacteria.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, estructuras de pared celular, efectores de virulencia, receptores, vías de transducción, TNF- α , SpA.

Abstract

The initial contact between pathogenic bacteria and host cells involves the participation of virulence effectors that are secreted or present as bacteria cell wall structures and proteins with receptor function, located in the cytoplasm or the plasma membrane of cells. This interaction modifies the molecular processes of the host cell which leads to the endocytic promotion/inhibition of the pathogen or its survival in the intracellular space. One of the most versatile human and animal pathogens is Staphylococcus aureus. The genome of this Gram-positive bacterium contains a set of genes coding for potential virulence effectors. Moreover, S. aureus cell wall is built on complex chemical structures that are capable of binding certain receptors and modifying the behavior of signal transduction molecules. In my laboratory, we have been interested in studying the possible molecular connection between the activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and the endocytosis of S. aureus by endothelial cells (EC). Our results indicate that the signaling pathway activated by the binding of TNF- α with its receptor TNFR1, increases not only the endocytic capacity of EC but also their power to kill cytoplasmic bacteria. Recent data indicate that protein A (SpA), a cell wall virulence effector of S. aureus, caused a marked decrease in the endocytic capacity of EC. At present, we are trying to explain the mechanism by which TNF- α and SpA, molecules that bind to the same TNFR1 receptor, activate an opposing endocytic response to S. aureus in order to establish the SpA contribution in the pathogenesis of this bacterium.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, cell wall structures, virulence effectors, receptors, transduction pathways, TNF- α , SpA.

Organización genómica de los efectores de virulencia de S. aureus

Staphylococcus aureus es un patógeno muy versátil que puede causar diferentes cuadros clínicos en humanos y animales. Los aislamientos de *S. aureus* de humanos se clasifican de acuerdo con su origen en “*adquiridos en hospital (AH)*” si provienen de brotes intrahospitalarios relacionados con intervenciones quirúrgicas u hospitalización prolongada. En cambio, las infecciones adquiridas fuera del hospital y que pueden ir desde intoxicaciones alimentarias hasta infecciones de piel o tejidos blandos, se conocen como “*adquiridas en la comunidad (AC)*” [1]. Parte de la versatilidad de *S. aureus* como patógeno reside en la dinámica de su genoma. En la actualidad se encuentran disponibles 14 genomas de *S. aureus* totalmente secuenciados, cuyas características más importantes se enlistan en la Tabla I.

Tabla I. Genomas secuenciados de *Staphylococcus aureus*^a

Cepa	Origen ^b	Tamaño pb	Núm. de Genes	Núm. de plásmidos	Cita
RF122	Bovino, SASM, Irlanda	2,742,531	2663	0	[2]
COL	Humano, SARM, Reino Unido	2,809,422	2723	1	[3]
JH1	Humano, endocarditis, SARM-AH, USA	2,906,507	2870	1	[4]
JH9	Humano, variante SAIV de JH1	2,906,700	2816	1	[4]
MRSA252	Humano, bacteremia, SARM-AH, Reino Unido	2,902,619	2845	0	[5]
MSSA476	Humano, osteomielitis, SASM-AC, Reino Unido	2,799,802	2723	1	[5]
MW2	Humano, septicemia pediátrica SARM-AC	2,820,462	2712	0	[6]
Mu3	Humano, SARhV, Japón	2,880,168	2776	0	[7]
Mu50	Humano, herida, SARM-AH, Japón	2,878,529	2775	1	[8]
N315	Humano, faringe, SARM-AH, Japón	2,814,816	2669	1	[8]
NCTC 8325	Humano, SASM, Reino Unido	2,821,361	2969	0	[9]
USA300	Humano, absceso, SARM-AC, clona epidémica USA	2,872,769	2648	3	[10]
USA300 TCH1516	Humano, SARM-AC clona epidémica USA	2,872,915	2802	1	[11]
Newman	Humano	2,878,897	2687	0	[12]

^a Modificada de [13].

^b SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; SASM, *S. aureus* sensible a meticilina; SAIV, *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina; SARhV, *S. aureus* con resistencia heterogénea a vancomicina; AC, adquirida en la comunidad; AH, adquirida en hospital. pb: pares de bases

Aunque en general no existen diferencias evidentes en el tamaño de los genomas, el número de genes o el número de plásmidos entre las cepas enlistadas en la Tabla I, la presencia y distribución de algunos genes en particular establece la diferencia en virulencia, resistencia, especificidad de hospedero y cuadro patológico asociado. Por ejemplo, entre las cepas MRSA252 y Mu50, ambas SARM-AH, la primera aislada de un caso de bacteremia y la segunda de una herida, comparten 2342 genes y sólo 329 son exclusivos de la cepa MRSA252 y 368 de la Mu50.

De acuerdo con su variabilidad genética, el genoma de *S. aureus* se agrupa de la siguiente manera [14-15]: i) genes basales (core genes), presentes en la mayoría de los aislamientos y altamente conservados; ii) genes basal-variables (core-variable genes) que se distribuyen ampliamente entre los diferentes aislamientos pero presentan una variabilidad genética considerable. A este grupo pertenecen la mayoría de los genes de virulencia y iii) genes que se encuentran asociados con elementos genéticos móviles, los cuales contienen a los demás genes de virulencia y representan el grupo de genes con mayor variabilidad.

Entre los elementos genéticos móviles más importantes en *S. aureus* se encuentran los casetes de resistencia a antibióticos, los plásmidos crípticos, los profagos, los transposones, las islas genómicas y las islas de patogenicidad. Uno de los casetes cromosómicos que confieren resistencia a antibióticos y que es importante en las cepas de *S. aureus* de origen clínico, es el casete cromosómico de resistencia a meticilina (SCC-mec). El SCC-mec contiene al gen que

confiere resistencia a metilicina (*mecA*) formando parte de un regulón conocido como complejo *mec*, constituido por los genes *mecA* y *mecR*. Además, este complejo presenta variantes en que el gen *mecR* puede ser interrumpido por las secuencias de inserción Ψ IS1272 o la IS431. Además, el SCC-*mec* contiene genes que codifican para recombinasas funcionales de la familia invertasa/resolvasa (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*) que presentan alelos múltiples. Un análisis de la composición del complejo *mec* y el alotipo del complejo *ccr*, reveló seis tipos distintos de SSC-*mec* útiles en la caracterización de las cepas de *S. aureus* [16].

Los plásmidos de *S. aureus* se clasifican en tres clases. Los de Clase I son menores a 5 kb, codifican uno a dos genes de resistencia a antibióticos y generalmente son transmitidos al ser empaquetados en bacteriófagos (transducción generalizada). Los de Clase II son de hasta 40 kb, codifican uno a varios genes de resistencia, y también se transmiten por transducción generalizada. Los de Clase III son como los de Clase II, pero presentan los genes *tra*, lo que les permite transmitirse por conjugación.

Los profagos son bacteriófagos integrados en el genoma bacteriano hasta que algún daño externo induce su escisión y posterior movilización a otras cepas. En *S. aureus*, se han descrito al menos cuatro profagos (ϕ Sa1-4) de los cuales los ϕ Sa1-3 codifican toxinas que son importantes en la patogenicidad.

Algunos genes de resistencia a antibióticos en *S. aureus* están codificados por transposones, de los cuales *Tn554*, *Tn552*, *Tn5801* y *Tn916-like* son los más comúnmente encontrados en aislamientos clínicos.

Las islas genómicas y las islas de patogenicidad son regiones del genoma que fueron adquiridas por transferencia horizontal desde otras cepas de *S. aureus* u otras especies de *Staphylococcus*. Al menos dos islas genómicas se han descrito en *S. aureus* (*vSa α* y *vSa β*). *vSa α* codifica genes de exotoxinas y lipoproteínas, mientras que *vSa β* codifica genes de exotoxinas y genes homólogos a proteasas de serina. Son cuatro las islas de patogenicidad descritas en *S. aureus* (SaPI1-4), las cuales contienen a genes de virulencia, superantígenos, la toxina de choque tóxico y las enterotoxinas B y C. La importancia de las islas de patogenicidad es su capacidad de ser transferidas entre diferentes cepas de *S. aureus* mediante transducción, utilizando bacteriófagos auxiliares. Una vez integrados en el genoma, las cepas que adquirieron las SaPIs no suelen ser infectadas por otros bacteriófagos, perpetuándose así la presencia de genes de virulencia en el genoma receptor [15].

Proteínas de secreción de *S. aureus* importantes en la patogénesis

En la Tabla II se enlistan los genes de virulencia más representativos de *S. aureus*, su localización en el genoma y su relevancia en la patogénesis. La lista comprende principalmente proteínas de superficie o de secreción, importantes en el establecimiento de la interacción con la célula hospedera o en la virulencia. Otros factores de virulencia intercelulares, como los sistemas de dos componentes están involucrados en la activación de la transcripción de genes de virulencia como *agr*, *sae* y *sar* [17] y no se consideran en esta descripción.

La versatilidad de *S. aureus* como patógeno se basa tanto en la diversidad de proteínas de superficie y de secreción que produce, como en la distribución de los genes que las codifican en regiones estables o variables del genoma, que incluso pueden estar asociadas con fenómenos de transferencia horizontal que incrementan la variabilidad de las cepas.

Tabla II. Genes de virulencia en *S. aureus*.^a

Factor de virulencia	Gen	Localización ^b	Relevancia en patogénesis
Exoenzimas			En general intervienen en la invasión de tejidos y la evasión de la respuesta inmune del hospedero
Proteasas de serina	<i>spl</i>	Isla genómica vSa α	
Stafilocinasa	<i>sak</i>	Profago	
Fosfodiesterasa, stafilocoagulasa, lipasas, proteasas de cisteína, proteasas de serina, proteasas de cisteína proteasa de serina V8, termonucleasa, hialuronidasa, aureolisina (proteasa de zinc), hidrolasas, proteasas ClpX	<i>plc, coa, lip, geh, htrA, sspB-C, sspA, nuc, hysA, aur, lytN, clpX</i>	Cromosómica	
Toxinas			
Exotoxinas/superantígenos	<i>set(s)</i> ^c	Isla genómica vSa β	Superantígeno ^d
Leucotoxinas D y E	<i>lukD, E</i>	SaPI	Evasión de defensa celular
Leucocidinas F y M	<i>lukF, M</i>	SaPI	Evasión de defensa celular
Leucocidina Pantón-Valentine	<i>lukS, F-PV</i>	SaPI	Evasión de defensa celular
Toxina 1 de síndrome de choque tóxico	<i>tst</i>	SaPI	Evasión de defensa celular, superantígeno, causa el síndrome de choque tóxico
Enterotoxinas	<i>se(s)</i>	Isla genómica vSa β	Evasión de defensa celular, superantígeno, causa intoxicaciones alimentarias
Hemolisinas α , β y δ	<i>hly, hlb, hla</i>	Cromosómica	Invasión tisular
Hemolisina γ	<i>hlgA, B, C</i>	Cromosómica	Potencia lisis celular
Toxinas exfoliativas	<i>eta, etb</i>	Cromosómica	Evasión defensa celular, causa escaldaduras en piel
Adhesinas			
Proteínas de unión a matriz extracelular	<i>ebhA, B</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
Proteínas de unión a elastina	<i>ebpS</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
Proteínas de unión a fibronectina	<i>fnbA, B</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
Proteínas de adhesión intercelular	<i>icaA, B, C, D</i>	Cromosómica	Adhesión intercelular, formación de biopelículas
Precursor de la adhesina de colágeno	<i>cna</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
Factores de agregación	<i>clfA, B</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
Proteínas ricas en Ser-Asp	<i>sdr</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
Otros			
Lipoproteínas	<i>lpl(s)</i>	Isla genómica vSa α	Interacción celular
Proteína A	<i>spa</i>	Cromosómica	Proteína antifagocítica, activa la respuesta inflamatoria
Proteínas de síntesis del polisacárido capsular	<i>capA-G</i>	Cromosómica	Adhesión intercelular, formación de biopelículas
Transportador ABC de Ferricromo	<i>fhuD</i>	Cromosómica	Transporte de hierro
Proteína de unión a IgG	<i>sbi</i>	Cromosómica	Antifagocítica
Sistema de incorporación de hierro	<i>isdA-G, srtB</i>	Cromosómica	Transporte de hierro

^a Refs. [13, 15, 17-18]. ^b La localización puede variar de una cepa a otra. ^c (s) denota la presencia de varios genes organizados en clusters. ^d Superantígeno: estimula receptores de los linfocitos T, potenciando la liberación de citocinas proinflamatorias.

La versatilidad de *S. aureus* como patógeno se basa tanto en la diversidad de proteínas de superficie y de secreción que produce, como en la distribución de los genes que las codifican en regiones estables o variables del genoma, que incluso pueden estar asociadas con fenómenos de transferencia horizontal que incrementan la variabilidad de las cepas.

Tipos de estructuras conservadas en la pared celular de *S. aureus*.

La mayor parte de los procariotes, exceptuando los micoplasmas y algunas arqueobacterias, poseen una pared celular (PC) rígida que rodea a la membrana celular con la cual tiene contacto. Esta PC presenta un espesor que varía entre 10 y 80 nm, y muestra una estructura algo compleja, dependiendo de la bacteria. Entre las funciones más importante de la PC están la de conferir rigidez a la estructura celular con el fin de proteger su contenido y mediar todas las interacciones bacterianas con su entorno.

La composición de la PC permite clasificar a las bacterias en tres grandes grupos: (a) Arqueobacterias, cuya PC es totalmente diferente a la PC bacteriana; (b) bacterias que poseen PC cuyo contenido es principalmente proteico, como las del género *Planctomyces* y (c) las bacterias cuya PC se distingue e identifica como positiva y negativa mediante la tinción de Gram.

La estructura principal de la PC de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas consiste en un esqueleto macromolecular rígido de peptidoglucano (PGN). En las bacterias Gram-positivas el PGN se encuentra inmerso en una matriz aniónica de polímeros de carbohidratos. Estas PC contienen ácidos teicoicos (polímeros de glicerol o ribitol fosfato) mientras que la PC de las bacterias Gram-negativas está rodeada por una membrana externa e inmersa en un espacio periplásmico, con presencia de lipopolisacáridos y lipoproteínas (Figura 1).

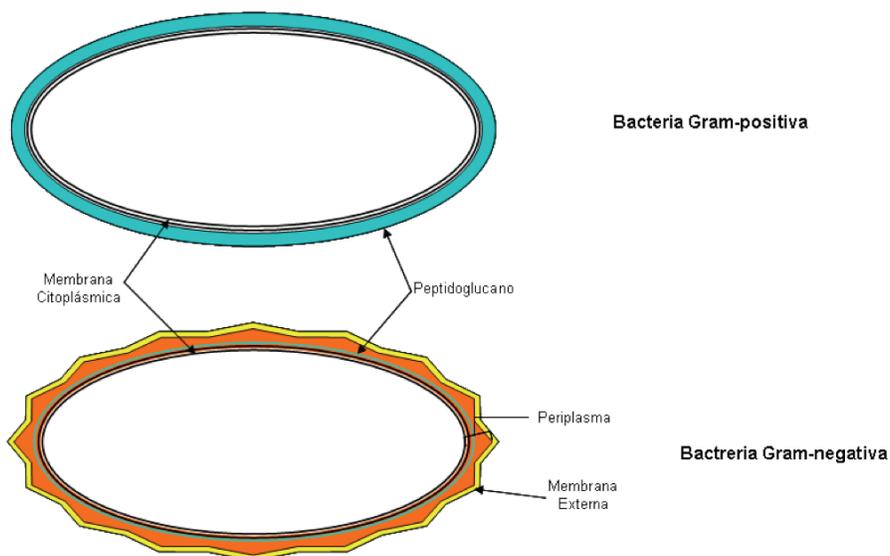


Figura 1. Esquema que ilustra las diferencias estructurales de la pared celular entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Por su importancia en el laboratorio, a continuación sólo se describirá en detalle la estructura de la PC de bacterias Gram-positivas. En estas bacterias el PGN representa el componente más abundante de su PC, donde la unidad fundamental está constituida por la repetición de un disacárido unido a un tetrapéptido, que a su vez se unen por enlaces peptídicos entre tetrapéptidos de cadenas diferentes. Particularmente, en *S. aureus*, el disacárido está constituido por ácido *N*-acetilmurámico- β (1-4)-*N*-acetilglucosamina (ANAM-NAG), el cual se

encuentra unido, vía ANAM, al tetrapéptido L-Ala-D-iGlu-L-Lys-D-Ala. Esta unidad fundamental de la PC de *S. aureus* se une a otra mediante puentes de penta-Gly (Figura 2) [19-20]. Este arreglo causa que la estructura global de la PC, dependiendo de la especie, sea una sola macromolécula gigante compuesta de 5 a 30 capas de la unidad fundamental (19, 21), la cual rodea a la célula bacteriana formando una envoltura rígida y continua con la misma forma celular. Este arreglo le confiere una gran rigidez a la PC que le permite soportar presiones de hasta 15 atmósferas, debido a: (i) el entrecruzamiento que existe entre las unidades fundamentales que la componen; (ii) a lo compacto que resulta el enlace $\beta(1-4)$ entre ANAM y NAG, generando uno de los carbohidratos más estables de la naturaleza y (iii) a la alternancia de D- y L-aminoácidos [22].

En las bacterias Gram-positivas el PGN puede representar hasta un 50% del peso de la PC, constituida por polímeros largos denominados: (a) ácidos teicoicos (AT), los cuales tienen hasta 30 unidades de glicerolfosfato o ribitolfosfato, unidos entre sí por enlaces fosfodiéster, que a su vez se unen covalentemente al -OH en posición 6 del ANAM, a través de una unidad de enlace variable según las especies; (b) ácidos teicurónicos (ATn), que se generan cuando escasea el fosfato y la bacteria se torna incapaz de sintetizar AT. Los ATn consisten en polímeros aniónicos formados por la alternancia de ácidos urónicos (que tienen grupos -COOH libres) y amino-azúcares como la NAG; (c) ácidos lipoteicoicos (AL) que están presentes en todas las bacterias Gram-positivas, aun en condiciones de carencia de fosfato. Estos son ácidos glicerol-teicoicos que se encuentran unidos a glucolípidos de la membrana citoplásmica por un enlace fosfodiéster, mientras que el otro extremo de la cadena queda expuesto al exterior [19]. Los tres componentes, AT, ATn y AL sobresalen de la superficie celular y suministran especificidad antigénica. Además, suministran una carga neta negativa a la PC, lo que permite captar cationes divalentes (p. ej., Mg^{2+}), necesarios para muchas actividades enzimáticas de la membrana citoplásmica o del espacio periplásmico y participan en la morfogénesis y división de la pared celular.

Las bacterias Gram-positivas poseen proteínas en su PC que interactúan con las proteínas de superficie de las células eucarióticas con el fin de establecerse en una posición única sobre la membrana citoplásmica o para evadir al sistema inmune del animal que está siendo colonizado por la bacteria. Una de estas proteínas, la proteína A (SpA), se encuentra unida covalentemente a los puentes de pentaglicina de la PC e inmunológicamente resulta ser muy interesante a pesar de que se desconoce su papel específico durante las infecciones causadas por *S. aureus* [19, 23]. SpA posee cinco dominios de enlace a inmunoglobulinas (Ig) en su porción N-terminal que son capaces de unirse a los dominios C_{H2} y C_{H3} de la región Fc de las IgG1, IgG2 e IgG4. Además, contiene dominios de enlace al factor von Willebrand y al receptor 1 del factor de necrosis tumoral alfa (TNRF1). Sin embargo, la actividad de estas inmunoglobulinas no provee de ningún tipo de protección a los animales infectados por *S. aureus*, a pesar de que se ha demostrado que algunas cepas de esta bacteria con mutaciones en SpA muestran defectos en la patogénesis de las infecciones causadas por *S. aureus* [19-20]. No obstante, SpA es un excelente modelo para entender cómo se anclan las proteínas de superficie a la PC de las bacterias Gram-positivas, además de que ha servido para realizar estudios inmunológicos y microbiológicos [23].

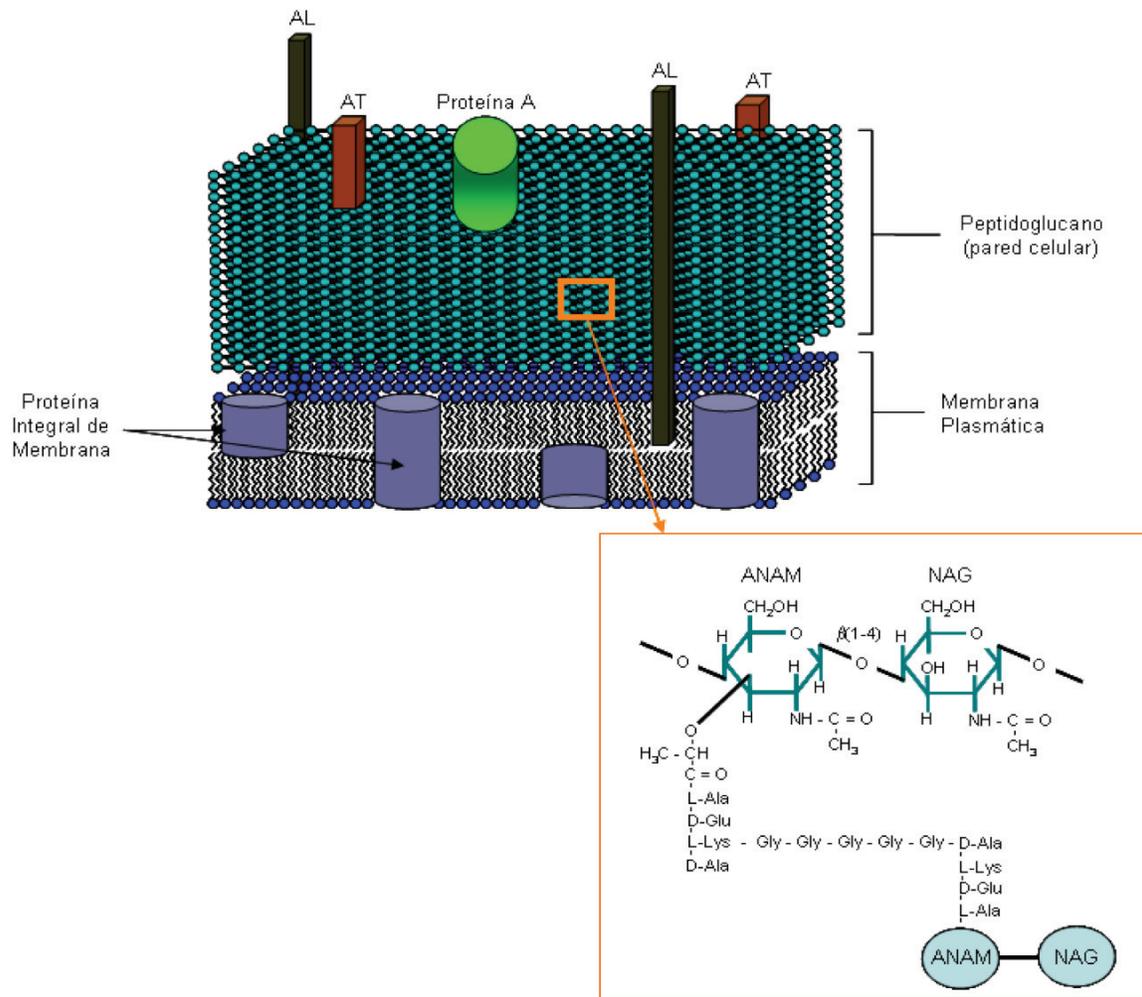


Figura 2. Esquema de la composición y estructura de la pared celular de bacterias Gram-positivas, en el cual se aprecia que el componente principal es el peptidoglucano. AL, ácido lipoteicoico; ANAM, ácido N-acetil murámico; AT, ácido teicoico; D-Ala, D-Alanina; D-Glu, D-Glutámico; L-Ala, L-Alanina; L-Lys, L-lisina y NAG, *N*-acetilglucosamina.

Las células tienen proteínas receptoras que reconocen estructuras conservadas en la pared celular de bacterias patógenas

Una de las características más importantes de la respuesta inmune innata es su capacidad para reconocer estructuras conservadas que están localizadas en la PC de las bacterias invasoras. La detección de tales estructuras químicas, le permite iniciar una serie de procesos celulares que conducen a la eliminación del patógeno. Ahora se sabe que la activación del sistema innato está en íntima relación con la activación de la respuesta inmune adaptativa, y se reconoce que sin la inmunidad innata no habría una defensa adaptativa eficiente.

Para lograr la detección funcional de una variedad de estructuras químicas presentes en la PC bacteriana, el sistema de inmunidad innata cuenta con proteínas que actúan como receptores. La historia de estos receptores comenzó en 1996 cuando Jules Hoffman demostró que el receptor Toll de *Drosophila melanogaster*, descubierto por Christiane Nusslein-Volhard, participaba tanto en el desarrollo embrionario como en la inmunidad del insecto contra infecciones por hongos. Un año después, en 1997, Ruslan Medzhitov y Charles Janeway Jr. de

la Universidad de Yale reportaron que los seres humanos tenían receptores parecidos a Toll. El primero de estos receptores tipo Toll (TLR) identificado fue TLR4 [24].

Los TLR son glucoproteínas transmembranales de tipo I localizadas en la membrana celular y endosómica. Estos receptores tienen un dominio rico en repetidos de leucina (LRR), encargado de reconocer las estructuras moleculares asociadas a patógenos (PAMPs), por lo cual se les considera como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) presentes en protozoarios, hongos, bacterias y virus. Se han identificado diez de estos PRRs en el humano con especificidades por PAMPs distintos. Así tenemos que los dímeros formados por TLR1-TLR2 y TLR2-TLR6 reconocen lipoproteínas o lipopéptidos presentes en la pared celular de bacterias Gram-positivas como *S. aureus*, TLR3 reconoce RNA viral de doble cadena, TLR4 reconoce LPS de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, TLR5 reconoce flagelina, TLR7 y TLR8 reconocen RNA de cadena sencilla y TLR9 detecta DNA microbiano [25]. Se ha propuesto que estos receptores se dimerizan cuando reconocen a sus respectivos ligandos y que la señal se transmite al interior de la célula mediante el reclutamiento de proteínas adaptadoras que interactúan con el dominio intracelular [26]. Estas moléculas adaptadoras (MyD88, MAL o TIRAP, TRIF y TRAM), activan a una familia de enzimas denominadas IRAK, y éstas a su vez promueven la translocación al núcleo y activación de NF- κ B. Como consecuencia de la activación de NF- κ B, la célula produce un conjunto de citocinas proinflamatorias y de defensa, que alertan y moldean la respuesta inmune adaptativa [27].

Las células animales tienen, además de los TLRs, otra clase diferente de moléculas que actúan como receptores intracelulares de PGN. Estas moléculas denominadas dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) se localizan en el citoplasma de las células presentadoras de antígeno (APC), tales como macrófagos y células dendríticas (DC) y células epiteliales [28]. Se han caracterizado dos receptores NOD, NOD1 y NOD2, cuya estructura comprende tres dominios principales: una región LRR C-terminal, la cual está involucrada en el reconocimiento del ligando, una región central que facilita su oligomerización y tiene actividad de ATPasa y una región N-terminal, compuesta de dominios de reclutamiento de caspasas (CARD).

Los péptidos derivados de PGN como el ácido γ -D-glutamil-meso-diaminopimélico (DAP) y el muramil dipéptido (MDP), son las estructuras reconocidas por NOD1 y NOD2, respectivamente. Después de que el dominio LRR de NOD reconoce a DAP o MDP, se recluta a RICK, una proteína cinasa de serina/treonina con un dominio CARD, por medio de interacciones CARD-CARD. Esta interacción produce una poli-ubiquitinación de IKK γ , seguido de la fosforilación de IKK β y de I κ B, lo cual causa la liberación y activación de NF- κ B [29]. Además de NF- κ B, la interacción de los ligandos con NOD resulta en la activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Aunque el detalle molecular se desconoce, se ha demostrado que la estimulación de NOD2 en macrófagos con MDP da lugar a la activación de p38 y ERK [30], mientras que la interacción de DAP con NOD1 resulta en la activación de JNK [31].

La respuesta fagocítica de las células es modulada por ciertos efectores presentes en bacterias patógenas

Algunas bacterias tienen la habilidad de impedir que los macrófagos las fagociten y las aniquilen en el citoplasma, por lo que permanecen en el espacio extracelular donde son capaces de contrarrestar la acción del complemento y de péptidos con actividad antimicrobiana [32]. Dentro de este grupo están *Yersinia* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* enteropatógena, las cuales interfieren con vías de señalización activadas por los receptores fagocíticos, evitando con ello a ser fagocitadas [33]. Sin embargo, existe otro grupo de patógenos conformados por bacterias tales como *Salmonella* sp., *Mycobacterium* sp. y algunas cepas de *E. coli* que promueven, activa o pasivamente, su propia fagocitosis [34].

Uno de los mecanismos de endocitosis más estudiados y mejor entendidos es el que corresponde a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Esta bacteria es uno de los agentes causales más importantes de enteritis en humanos, los cuales nos infectamos principalmente por la ingestión de agua o alimentos contaminados. En el intestino, *S. enterica* es capaz de atravesar la mucosa y escapar de la muerte causada por las enzimas digestivas, las sales biliares, IgA secretora, péptidos antimicrobianos y otras defensas de la respuesta inmune innata. El proceso de endocitosis de *S. enterica* por células epiteliales es complejo y requiere de la acción concertada de al menos cinco factores o efectores de virulencia del sistema de secreción tipo 3 (T3SS), que se encuentran localizados en la isla de patogenicidad 1 (Spi1). El contacto de *S. enterica* con la superficie celular activa la expresión de genes efectores de Spi1; algunos de los productos de estos genes son importantes para ensamblar la estructura del T3SS, que semeja una forma tipo jeringa, y a través de la cual la bacteria inyecta los efectores que modularán la respuesta endocítica de la célula hospedera [35].

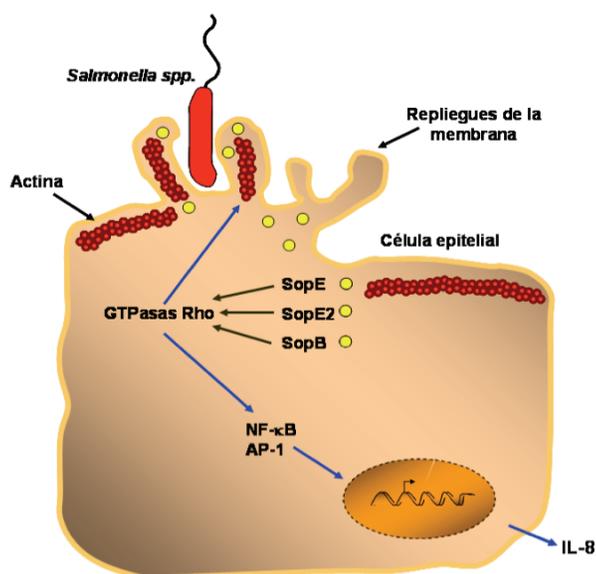


Figura 3. Esquema que ilustra la acción de los factores de virulencia inyectados a través del sistema de secreción tipo 3 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que promueven la macropinocitosis de la bacteria y la respuesta inflamatoria (Modificada de 35).

Se ha demostrado que los efectores SopE, SopE2 y SopB activan a las Rho-GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoG, lo que ocasiona un re-arreglo de la arquitectura del citoesqueleto de actina, el repliegue ("ruffling") de la membrana y finalmente la internalización de la bacteria por macropinocitosis [36]. SopE y SopE2 tienen actividad como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, mientras que SopB es una fosfatasa de fosfoinosítidos. La activación de estas Rho-GTPasas da como resultado la activación de dos miembros de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich, N-WASP y WAVE2, las cuales reclutan al complejo de proteínas relacionadas con actina (Arp2/3) a los sitios de repliegues membranales y de polimerización de actina (Figura 3). Los otros dos efectores, SipA y SipC actúan en forma orquestada y promueven la internalización de la bacteria mediante su unión y modulación dinámica de los filamentos de actina. Aparte de la función descrita, SopE, SopE2 y SopB, estimulan a Cdc42, y ésta a su vez activa a las MAPK JNK, Erk y p38, que se encargan de activar a NF-κB y a la proteína activadora AP-1. Esta serie de eventos tiene como consecuencia la aparición de una reacción inflamatoria en el intestino y los signos clínicos de diarrea y dolor abdominal subyacentes [37].

Existe otro grupo de bacterias que se internalizan mediante un mecanismo que no involucra el ensamblaje de sistemas de secreción. Dentro de este grupo se encuentra a *S.*

aureus, el cual es un patógeno causal de infecciones intra-hospitalarias del humano. Debido a que se ha estudiado con cierto detalle el proceso de internalización de *S. aureus* en células endoteliales (CE) y que nuestro objetivo en el laboratorio ha sido precisamente el estudio de los factores que modulan la endocitosis de esta bacteria en endotelio, a continuación se describe brevemente la participación de algunas moléculas que intervienen en las etapas de este proceso.

Se considera que la adherencia de *S. aureus* a la superficie celular es el primer paso en el proceso de colonización e infección de la célula hospedera [38]. Para adherirse a la superficie celular, *S. aureus* expresa un conjunto de adhesinas, denominadas componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs). Entre estas adhesinas se encuentran la proteína de unión a fibronectina (FnBP), la proteína de unión a fibrinógeno, la adhesina de unión a elastina y la adhesina de unión a colágeno [38-40]. Aunque estas adhesinas bacterianas inducen la invasión eficiente a fagocitos no profesionales (p. ej. células epiteliales y endoteliales), experimentos con CE de humano muestran que la invasión mediada por FnBPA de *S. aureus*, es particularmente lenta e ineficiente. La adhesina estafilocócica FnBPA dispara la formación de sitios de unión de adhesión fibrilar que rodean a la bacteria y median su translocación centrípeta sobre la superficie celular (Figura 4A). La translocación de la bacteria causa que se generen múltiples copias y colas de actina que propulsan a la bacteria sobre la superficie de la célula (Figura 4B). Los movimientos y la reorganización de actina son regulados por la tensina de adhesión fibrilar (Figura 4C). Así, la señalización de integrinas estimulada por FnBPA promueve la movilidad de *S. aureus* sobre la superficie de la CE, pero retarda la invasión bacteriana, pudiendo constituir una estrategia de *S. aureus* el retraso de la invasión hasta que sus toxinas llegan a ser efectivas [41]. *S. aureus* puede activar la respuesta inflamatoria iniciada por macrófagos al ser reconocido por receptores intracelulares como las proteínas Nod. Estas proteínas pueden reconocer motivos estructurales del PGN de *S. aureus* [42]. Aunque algunos componentes de superficie de *S. aureus* son pro-inflamatorios, lo cual significa que activan la expresión de quimiocinas y evocan la afluencia de leucocitos y especialmente de células fagocíticas [43], esta bacteria también tiene mecanismos para evadir la fagocitosis.

Uno de los componentes de la PC de *S. aureus* que desempeña un papel importante como efector de virulencia es SpA. Estudios de co-inmunoprecipitación con células epiteliales de pulmón de humano, permitieron detectar la interacción entre SpA y TNFR1 [44]. Esta interacción causó un incremento en la actividad de NF- κ B. La interacción SpA-TNFR1 también provocó la activación de las cinasas pro-inflamatorias p38 y JNK1/2 que fosforilan ATF-2, un componente del factor transcripcional AP-1. La estimulación de ambos factores de transcripción, NF- κ B y AP-1, median la expresión de la quimiocina interleucina-8 (IL-8). De forma complementaria, experimentos *in vivo* mostraron que la vía de señalización SpA-TNFR1, causó el proceso de inflamación por el reclutamiento de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), lo cual se propone como la causa de la neumonía por *S. aureus* en ratones [44].

Importancia de la vía de transducción mediada por TNFR1 en la interacción entre *Staphylococcus aureus* y células endoteliales

La respuesta inflamatoria es un proceso importante en el control de infecciones causadas por microorganismos patógenos. Esta respuesta es iniciada y controlada por la producción de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). TNF- α , es producido principalmente por macrófagos, neutrófilos y linfocitos T; presenta una variedad de funciones en el organismo, como la modulación de la respuesta inmune, la homeostasis de los tejidos, el desarrollo embrionario, la apoptosis y la patogénesis del choque tóxico [45-47]. Esta citocina ejerce su actividad biológica al activar vías de señalización a través de dos receptores, el receptor tipo 1 (TNFR1) y el receptor tipo 2 (TNFR2). TNFR1 tiene un peso molecular de 50-60 kDa y también es conocido como p55TNFR, TNFRSF1 o CD120a, mientras que el TNFR2, el cual tiene un peso molecular de 70-80 kDa, es conocido como p75TNFR,

TNFRSF1b o CD120b. A la fecha, se sabe que la superfamilia a la que pertenecen estos receptores está formada por 29 miembros, los cuales se caracterizan por poseer dominios repetidos ricos en cisteína en su porción extracelular [48].

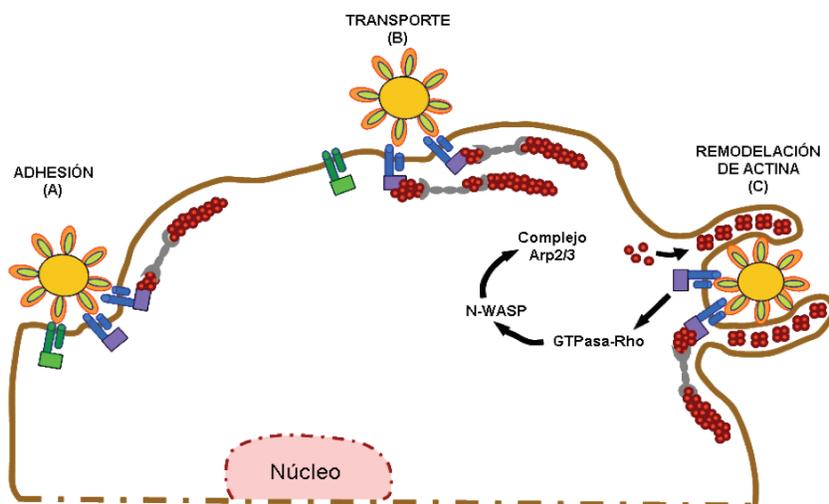


Figura 4. Etapas en la endocitosis de *Staphylococcus aureus* por las células endoteliales. (A) La adhesión de *S. aureus* a la membrana de las células endoteliales se establece por la interacción entre la proteína de unión a fibronectina-fibronectina e integrinas; (B) la translocación de *S. aureus* sobre la superficie celular causa la polimerización de actina y (C) la remodelación del citoesqueleto de actina causa la endocitosis de *S. aureus*, en un proceso en el cual se propone que pueden participar Rho, N-WASP y Arp2/3 (Modificada de 41).

De los dos receptores, el que ha sido más ampliamente estudiado es TNFR1, posiblemente debido a que: 1) se expresa de manera constitutiva en muchos tipos celulares, en cambio, la expresión de TNFR2 está altamente regulada y generalmente sólo se encuentra en células del sistema inmune; 2) en la mayoría de las células, TNFR1 parece ser el principal mediador en la vía de señalización activada por TNF- α , mientras que TNFR2 parece ser importante únicamente en células del sistema linfóide y 3) TNFR2 sólo puede ser activado eficientemente por TNF- α de membrana y no por TNF- α soluble [49]. Lo anterior ha causado que muchas de las investigaciones que se han realizado para entender la función de TNF- α estén descritas por su interacción con TNFR1. Aunado a esto, se sabe que TNFR1 y TNFR2 son estructuralmente diferentes, lo que supone que dichos receptores tienen funciones biológicas distintas.

TNFR1 contiene cuatro dominios repetidos ricos en cisteína en su región extracelular, las cuales forman estructuras alargadas que interactúan con el ligando [49-50]. TNFR1 también posee un dominio extracelular adicional encargado del ensamble trimérico del receptor, aun en ausencia del ligando. Por esta razón se le ha denominado como dominio de ensamble previo a la unión del ligando (PLAD). Este ensamble previo es necesario para la formación del complejo trimérico de TNFR1, lo cual es fundamental para la unión de TNF- α y la activación de la vía de señalización [48].

La región intracelular de TNFR1 está conformada por un dominio denominado dominio de muerte el cual le permite reclutar proteínas adaptadoras que también contienen dominios de muerte y que están implicadas en vías de señalización de muerte celular (apoptosis) en varios

tipos de células [50]. Aunque se sabe que la unión de TNF- α a TNFR, también activa las vías de señalización que intervienen en la proliferación y diferenciación celular [51].

El sitio principal de acción de TNF- α son las células endoteliales que recubren el interior de los vasos sanguíneos. Durante la respuesta inflamatoria, las células endoteliales responden al estímulo ejercido por TNF- α expresando moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas que promueven el reclutamiento de PMNs hacia el sitio de infección [52-53]. Tal función de TNF- α está controlada principalmente por medio de la activación de tres vías de señalización, una en la que participa NF- κ B y las otras dos vías en las que participan las proteínas cinasas JNK y p38 (Figura 5) [46].

En el caso de la activación de NF- κ B, la unión de TNF- α a TNFR1 causa el reclutamiento de la proteína asociada a TNFR vía TRADD que interactúa con la región citoplásmica de TNFR1. Después TRADD interactúa con el factor asociado al receptor de TNF- α (TRAF2). Las otras proteínas importantes en esta ruta, y que probablemente tienen un papel fundamental en la activación de NF- κ B, son la proteína cinasa de serina/treonina asociada al receptor (RIP) y la proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógeno 3 (MAPKKK3). Esto causa la activación de una cinasa específica de I κ B α (IKK), la cual forma parte de un complejo formado por tres proteínas, IKK α , IKK β e IKK γ (NEMO). IKK α e IKK β catalizan la fosforilación de I κ B α , mientras que IKK γ solamente regula esta actividad y no tiene actividad intrínseca de cinasa. La fosforilación de I κ B α , así como su ubiquitinación son necesarias para la degradación de I κ B α por el proteasoma 26S, dando como resultado la liberación y translocación al núcleo de NF- κ B [54].

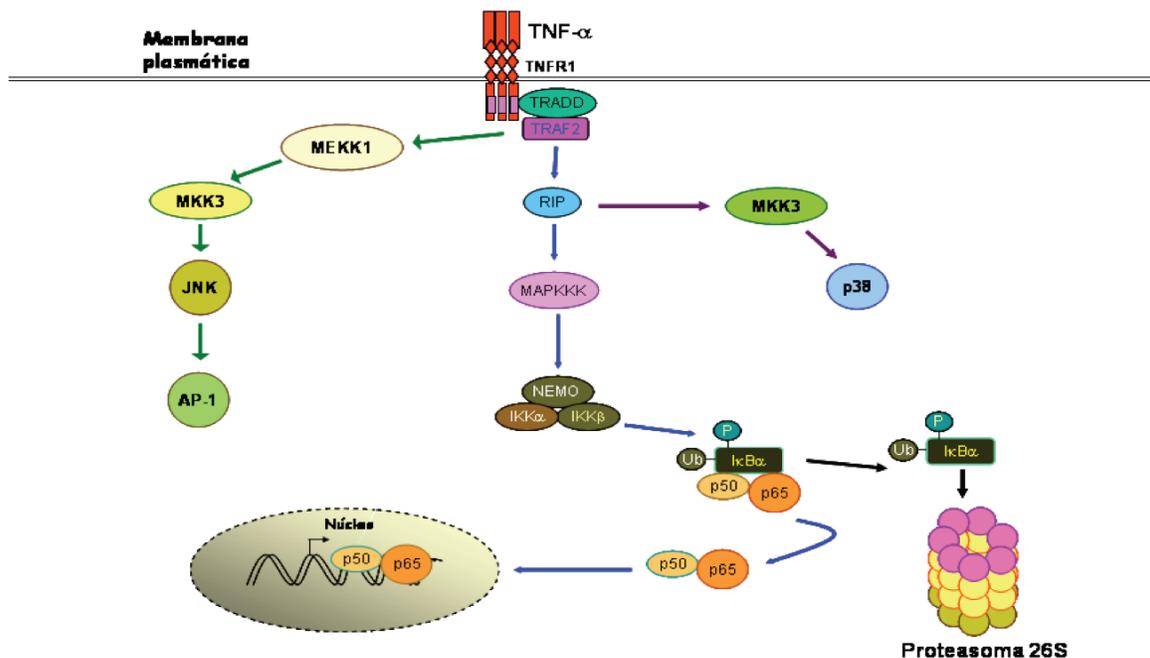


Figura 5. Vías de transducción activadas a través del receptor 1 (TNFR1) de TNF- α . La unión de TNF- α a TNFR1 trimérico provoca el reclutamiento de proteínas adaptadoras (TRADD y TRAF2) hacia el receptor. Esta señal activa la participación de una serie de proteínas cinasas que conducen a la activación de JNK, p38 y en el caso de NF- κ B (heterodímero p50/p65), a su separación de la proteína inhibidora (I κ B), quedando libre para translocarse al núcleo.

TNF- α induce la activación de la vía de JNK a través de TRAF2. Después de su activación, JNK se transloca al núcleo e incrementa la actividad transcripcional de algunos factores de transcripción como c-Jun y ATF2. c-Jun es una proteína que se dimeriza para formar a la proteína activadora 1 (AP-1), la cual es un factor de transcripción. AP-1 tiene una participación importante en procesos celulares como la proliferación y diferenciación celular, así como en la inducción y prevención de la apoptosis. La activación de p38 parece estar mediada por TRAF2 y RIP (Figura 5) y se sabe que p38 es un mediador importante del proceso inflamatorio y que además puede estar involucrado en la transactivación de NF- κ B [49].

Es importante resaltar la participación que estas vías de señalización tienen en la respuesta inflamatoria, lo cual evidencia la importancia de las células endoteliales (CE) en la patogénesis de infecciones que cursan con la producción de TNF- α , como por ejemplo las infecciones por *S. aureus*. Un número considerable de investigaciones demuestran que *S. aureus* puede ser endocitado por las CE [55-56], aunque los mecanismos y factores involucrados no han sido totalmente descritos. De modo que la posibilidad de que las vías TNF- α -TNFR1-NF- κ B y/o JNK/p38 pudieran ser mediadoras del proceso de endocitosis, no había sido considerada. Un primer reporte en el que se planteó la participación de TNF- α en la interacción entre *S. aureus* y las células endoteliales de cordón umbilical de humano, demostró que la adhesión de *S. aureus* a las células se incrementó por el tratamiento con esta citocina [57]. Sin embargo, estos investigadores no evaluaron la implicación de alguna de las vías de señalización que TNF- α activa en el endotelio.

En nuestro laboratorio hemos obtenido evidencias experimentales de que la vía de transducción activada por TNF- α es importante en la endocitosis de *S. aureus* por las CE. Los resultados obtenidos demuestran que TNF- α incrementa la capacidad de las CE de cordón umbilical de bovino para fagocitar a *S. aureus*. Como se observa en la Figura 6 [58] TNF- α causó un incremento en el número de bacterias intracelulares recuperadas. Hemos también observado que las células endoteliales de bovino (CEB) son capaces de matar a *S. aureus* intracelular y que TNF- α incrementa dicha capacidad [59]. Ambos resultados permiten suponer que tanto NF- κ B como JNK o p38 podrían estar involucrados en los procesos de endocitosis y supervivencia intracelular de *S. aureus* en las CEB.

Experimentos realizados con inhibidores específicos de las diferentes vías que pueden ser activadas por TNF- α han permitido demostrar que la endocitosis de *S. aureus* por las CEB está asociada con la activación de NF- κ B, pero no de JNK o p38. El tratamiento de las CEB con BAY y SN50, ambos inhibidores de NF- κ B, provocaron una reducción significativa en el número de bacterias intracelulares recuperadas (Figura 7, en 58). Estos resultados sugieren no sólo que la actividad basal de NF- κ B es importante para la endocitosis de *S. aureus*, sino también permiten suponer que la bacteria *per se* podría estar activando a este factor. Tenemos evidencia reciente de que *S. aureus* promueve la translocación al núcleo de NF- κ B (Oviedo-Boyso y Baizabal-Aguirre, datos no publicados), lo cual ayudaría a explicar la expresión de genes para adhesinas, quimiocinas y moléculas de señalización durante la endocitosis de *S. aureus* por células endoteliales de humano [60]. Sin embargo, queda por determinar el mecanismo empleado por *S. aureus* para activar a NF- κ B en las células endoteliales.

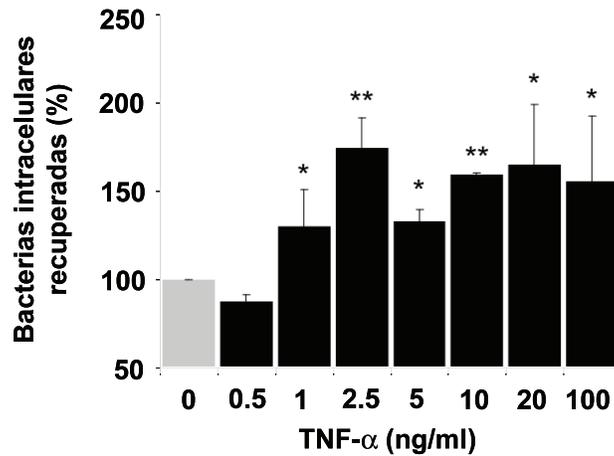


Figura 6. TNF- α incrementa la endocitosis de *S. aureus* por las células endoteliales de bovino. Las células endoteliales de bovino fueron cultivadas y posteriormente tratadas con concentraciones crecientes de TNF- α durante 4 h y después infectadas con *S. aureus* (1×10^6 UFC/ml por 20 min). Las bacterias extracelulares se eliminaron con lisostafina y las bacterias intracelulares se recuperaron mediante lisis de las células endoteliales. Las bacterias se cultivaron en agar Luria-Bertani a 37°C por 19-24 h. Los datos representan la media \pm el error estándar de al menos tres experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$, comparados con el control no tratado.

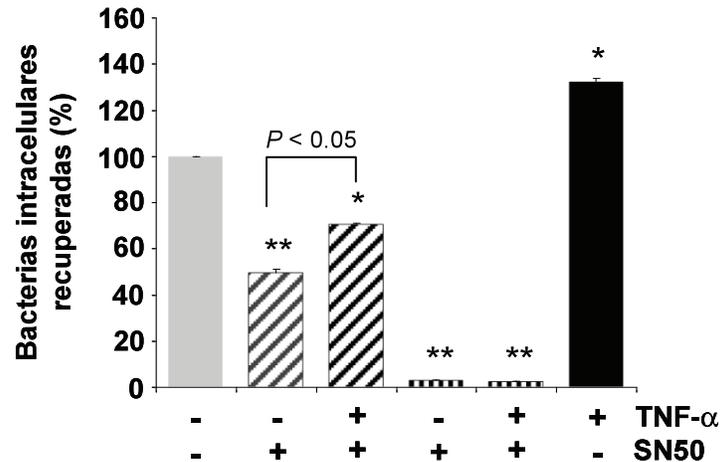


Figura 7. La vía de señalización de NF- κ B está involucrada en la endocitosis de *S. aureus* por las células endoteliales de bovino. Las células endoteliales se trataron bajo las siguientes condiciones: células control no tratadas (columna gris), 50 μ M de SN50 (péptido que inhibe la translocación de NF- κ B al núcleo) y 50 μ M de SN50 seguido de 2.5 ng/ml de TNF- α (columnas con líneas diagonales), 100 μ M de SN50 y 100 μ M de SN50 seguido de 2.5 ng/ml de TNF- α (columnas con líneas verticales). El tratamiento con TNF- α (columna en negro) fue incluido como control. Después de los respectivos tratamientos, las células endoteliales se infectaron con 1×10^6 UFC/ml de *S. aureus*. Las bacterias extracelulares se eliminaron con lisostafina y las bacterias intracelulares se recuperaron por lisis de las células endoteliales y se cultivaron en agar Luria-Bertani a 37°C por 19 a 24 h. Los datos representan la media \pm el error estándar de al menos tres experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$, comparados con el control no tratado.

Se sabe que *S. aureus* posee una amplia gama de componentes estructurales que pueden interactuar con receptores de diferentes células del sistema inmune y de esta forma activar a NF- κ B [61]. Recientemente, se reportó que SpA de *S. aureus* se une a TNFR1 de células epiteliales de pulmón de humano, lo que causa la activación de NF- κ B, JNK y p38. Esta señal hace que la interacción entre SpA y TNFR1 sea esencial en la patogénesis de la neumonía causada por *S. aureus* [44]. SpA no solo actúa como un ligando que puede imitar la activación de TNFR1 por TNF- α , sino que también estimula la separación del ectodominio de TNFR1 de la superficie de células epiteliales y de macrófagos. La liberación de la región extracelular de TNFR1 (TNFR1 soluble, TNFR1s) neutraliza a TNF- α disponible, así como a SpA, con lo cual el sistema logra disminuir la señalización vía TNFR1 y frenar el proceso inflamatorio [44]. La separación de TNFR1 de la membrana plasmática es un proceso mediado por TACE, la enzima convertidora de TNF- α , que se activa por la interacción de SpA con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esta unión causa la fosforilación de TACE a través de una cascada mediada por las cinasas c-Src-ERK1/2 [62].

La manera en que SpA interactúa con TNFR1 y activa la vía de señalización es por medio de su región de unión a IgG [63]. Diversos estudios han mostrado que el dominio de unión a IgG de SpA reconoce también al EGFR, aunque de manera independiente de TNFR1, como lo indica el comportamiento de dos mutantes del dominio IgG de SpA, las cuales conservaron la habilidad de inducir la producción de IL-8, pero fallaron en inducir la liberación de TNFR1s [62]. Así, cada uno de los dominios repetidos del dominio de unión a IgG de SpA puede afectar múltiples respuestas inmunes, por ejemplo activando la inflamación a través de TNFR1, frustrando la opsonización por su interacción con los dominios Fc de IgG, y limitando la vía de señalización mediada por TNFR1, a través de la liberación de TNFR1s.

Considerando que TNF- α y SpA activan las mismas vías de señalización a través de TNFR1, y que TNF- α aumenta la endocitosis de *S. aureus* por las CEB, es posible considerar que SpA también afecte este proceso. En nuestro laboratorio hemos observado que el tratamiento de las CEB con SpA antes de la infección con *S. aureus*, reduce de manera significativa la endocitosis de esta bacteria (Figura 8). Es decir, SpA tiene un efecto opuesto a TNF- α en lo que se refiere a la capacidad endocítica de las CEB por *S. aureus* (comparar los resultados de las Figuras 6 y 8). Estos efectos opuestos podrían explicarse en función de que estímulos diferentes inducen una expresión diferencial de genes, aunque regulados por el mismo factor de transcripción. Además, hemos observado que las células endoteliales son capaces de recuperar de manera progresiva tiempo-dependiente, la capacidad de endocitar a *S. aureus* cuando se retira a SpA del medio de cultivo y se les incuban sin tratamiento adicional por 2 y 6 h (Figura 8).

Algunas alternativas que podrían explicar la recuperación de la capacidad endocítica de las células endoteliales son: (i) TNFR1 es desensibilizado por SpA, de tal forma que las células endoteliales requieren de un periodo de síntesis *de novo* del receptor y/o (ii) SpA causa una intensa movilización al núcleo de NF- κ B, de tal manera que las reservas citosólicas de este factor de transcripción se agotan y las células endoteliales deben entrar en un periodo de síntesis activa de NF- κ B. La primera interpretación se sustenta en las evidencias que indican que la exposición de células epiteliales a SpA causa que el dominio extracelular de TNFR1 se desprenda de la membrana [44], provocando que las células se desensibilicen y conduciéndolas a un periodo refractario a los estímulos que dependen de TNFR1. En cuanto a la segunda alternativa, hemos observado que el tratamiento de las CE con TNF- α , después de un periodo de reposo de 2 h, posterior al tratamiento con SpA, causa la recuperación de la capacidad fagocítica de las células (Figura 8). La recuperación fue aún mayor cuando las CEB se trataron con IL-1 β , citocina que se une a su propio receptor de membrana (IL-1R) y que también activa a NF- κ B. En conjunto estos resultados indican que posiblemente la localización citoplásmica de

NF- κ B se ha restablecido y en cambio, que la abundancia relativa de TNFR1 en la membrana plasmática de las CE no se había recuperado.

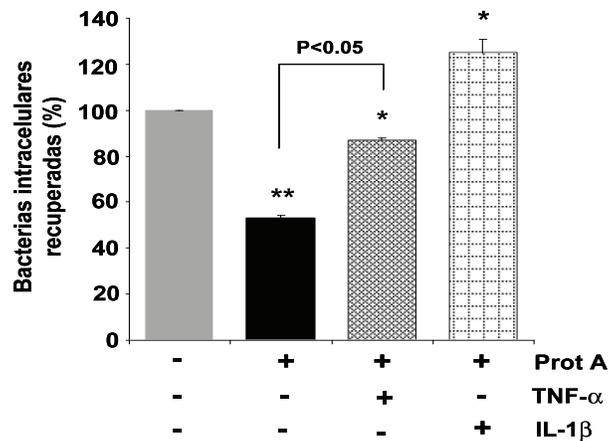


Figura 8. SpA disminuye la capacidad endocítica de las células endoteliales de bovino por *S. aureus*. Las células endoteliales se incubaron durante 1 h con 5 μ g/ml de SpA (columna en negro); después de retirar SpA del medio de cultivo, las células se dejaron en incubación durante 2 h sin tratamiento adicional, y posteriormente se trataron con 3 ng/ml de TNF- α (columna con rombos) o 20 ng/ml de IL-1 β (columna con cuadros) durante 4 h. Las células se infectaron con *S. aureus* (1×10^6 UFC/ml) durante 20 min. Los datos representan la media \pm el error estándar de al menos tres experimentos independientes. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$, comparados con el control sin tratamiento.

Perspectivas

El estudio de las bases moleculares de la interacción entre bacterias patógenas y células de mamífero ha progresado notablemente durante la última década, debido al descubrimiento y caracterización de receptores que son clave en el reconocimiento de los efectores de virulencia secretados o de las estructuras conservadas presentes en la pared celular de los microorganismos. El avance ha sido acelerado gracias a la identificación de los mecanismos de patogénesis en modelos murinos experimentales, de los cuales se ha obtenido información valiosa para desarrollar biofármacos que bloquean los efectos de efectores producidos por el patógeno. En este sentido, se han hecho hallazgos fundamentales en lo que se refiere al proceso de internalización de bacterias en fagocitos no profesionales. Se espera que en los próximos 10 años se tenga un mayor avance en el conocimiento de los mecanismos que las bacterias emplean para sobrevivir en el interior celular, y de cómo los efectores bacterianos afectan el funcionamiento de las moléculas que mantienen viable a las células.

En particular, en mi laboratorio pretendemos a corto plazo establecer la conexión que existe entre la vía de transducción canónica activada por TNF- α /SpA y la remodelación de la arquitectura del citoesqueleto, que da lugar a un aumento/disminución en la capacidad endocítica de las células endoteliales por *S. aureus*. Para lograr este objetivo hemos iniciado un estudio molecular para identificar en primer lugar las citocinas que se expresan después de estimular a las células endoteliales con TNF- α /SpA y determinar si ambos péptidos activan la translocación al núcleo del mismo heterodímero de NF- κ B. Además, tenemos evidencia experimental preliminar de que la enzima fosfoinosítido 3-cinasa (PI-3K) participa en el proceso de internalización de *S. aureus*. Esta información es muy importante porque se ha establecido que las células endoteliales endocitan a *S. aureus* por medio de la activación de integrinas y estas moléculas a su vez están conectadas con la activación de PI-3K, Akt, NF κ B y el re-arreglo

del citoesqueleto de actina. La interrelación entre la vía activada por TNF- α /SpA y la de integrinas (activada por la proteína de unión a fibronectina de *S. aureus*) colocaría a TNFR1 como un receptor asociado con la internalización de bacterias y abriría un nuevo camino en el estudio para el control de la patogénesis de *S. aureus* en células animales.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, mediante el proyecto 14.4 otorgado a VMBA.

Referencias

1. Bustos-Martínez, J.A., Hamdan-Partida, A. y Gutiérrez-Cadenas, M. (2006) *Rev. Biomed.* **17**, 287-305.
2. Herron-Olson, L., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M. y Kapur, V. (2007) *PLoS ONE* **2**, e1120.
3. Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., Deboy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J. F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Madupu, R., Angiuoli, S.V., Durkin, A. S., Haft, D. H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I. R., Nelson, K. E. y Fraser, C.M. (2005) *J. Bacteriol.* **187**, 2426-2438.
4. Mwangi, M. M., Wu, S. W., Zhou, Y., Sieradzki, K., de Lencastre, H., Richardson, P., Bruce, D., Rubin, E., Myers, E., Siggia, E.D. y Tomasz A. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 9451-9456.
5. Holden, M.T.G., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day N.P.J., Enright, M.C., Foster, T.J. Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutheford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G., y Parkhill, J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 9781-9786.
6. Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui L., Yamamoto, K. y Hiramatsu, K. (2002) *Lancet* **359**, 1819-1827.
7. Neoh, H. M., Cui, L., Yuzawa, H., Takeuchi, F., Matsuo, M. y Hiramatsu, K. (2008) *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 45-53.
8. Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Kobayashi, N., Tanaka, T., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. y Hiramatsu, K. (2001) *Lancet* **357**, 1225-1240.
9. Gillaspay, A.F., Worrell, V., Orvis, J., Roe, B. A., Dyer, D. W. y Landolo, J.J. (2006) The *Staphylococcus aureus* NCTC8325 genome. En Fischetti, V., Novick, R., Ferretti, J., Portnoy, D. y Rood, J. (Eds.) *Gram Positive Pathogens*. ASM Press.
10. Diep, B. A., Gill, S. R., Chang, R. F., Phan, T. H., Chen, J. H., Davidson, M. G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H. A., Mongodin, E. F., Sensabaugh, G. F. y Perdreau-Remington, F. (2006) *Lancet* **367**: 731-739.
11. Highlander, S.K., Hulten, K.G., Qin, X., Jiang, H., Yerrapragada, S., Mason Jr., E.O., Shang, Y., Williams, T., Fortunov, R.M., Liu, Y., Igboeli, O., Petrosino, J., Tirumalai, M., Uzman, A., Fox, G.E., Cardenas, A.M., Muzny, D.M., Hemphill, L., Ding, Y., Dugan S., Blyth, P.R., Buhay, C.J., Dinh, H.H., Hawes, A.C., Holder, M., Kovar, C.L., Lee, S.L., Liu, W.L., Nazareth, N.V., Wang, Q., Zhou, J., Kaplan, S.L. y Weinstock, G.M. (2007). *BMC Microbiol.* **7**, 99.
12. Baba, T., Bae, T., Schneewind, O., Takeuchi, F. y Hiramatsu, K. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 300-310.
13. Holden, M. T. G. y Lindsay J.A. (2008) Whole genomes: sequence, microarray and systems biology. En Lindsay, J.A. (ed.). *Staphylococcus molecular genetics*. Caister Academic Press. Norfolk, U. K. pp. 1-28.
14. Lindsay, J.A., Moore, C.E., Day, N.P., Peacock, S.J., Witney, A.A., Stabler, R.A., Husain, S.A., Butcher, P.D. y Hinds, J. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 669-676.
15. Lindsay, J.A. y Holden M.T.G. (2006) *Funct. Integr. Genomics.* **6**, 186-201.
16. de Lencastre, H., Oliveira, D. y Tomasz, A. (2007) *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 428-435.
17. Cheung, A. L. (2001) Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. Honeyman, A.L., Friedman, H. y Bendinelli, M. (eds.) *Staphylococcus aureus infection and disease*. Kluwer-Academic / Plenum Publishers. New York, USA. pp 295-321.

18. Feng, Y., Chen, C.-J., Su, L.-H., Hu, S., Yu, J. y Chiu C.-H. (2008) *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 23-37.
19. Navarre, W. W. y Schneewind, O. (1999) *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **63**, 174-229.
20. Marraffini, L. A., DeDent A. C. y Schneewind, O. (2006) *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **70**, 192-221.
21. Snowden, M. A. y Perkins, H. R. (1990) *Eur. J. Biochem.* **191**, 373-377.
22. Nakagawa, J., Tamaki S., Tomioka, S. y Matsushashi, M. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13937-13946.
23. DeDent, A. C., McAdow M. y Schneewind, O. (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 4473-4484.
24. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. y Janeway, C.A., Jr. (1997) *Nature* **388**, 394-397
25. Uematsu, S. y Akira, S. (2008) *Handb. Exp. Pharmacol.* **183**, 1-20
26. O'Neill, L.A. y Bowie, A.G. (2007) *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 353-364
27. Kawai, T. y Akira, S. (2005) *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 338-344
28. Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A. y Watanabe, T. (2006) *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 9-20
29. Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W. y Dixit, V. M. (2004) *Nature* **427**, 167-171
30. Pauleau, A. L. y Murray, P. J. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7531-7539
31. Girardin, S. E. Tournebise, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., Bertin, J., DiStefano, P. S., Yaniv, M., Sansonetti, P. J. y Philpott, D. J. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 736-742.
32. Wurzner, R. (1999) *Mol. Immunol.* **36**, 249-260.
33. Celli, J. y Finlay, B. B. (2002) *Trends Microbiol.* **10**, 232-237.
34. Knodler, L. A., Celli, J. y Finlay, B. B. (2001) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 578-588.
35. Haraga, A., Ohlson, M. B. y Miller, S. I. (2008) *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 53-66.
36. Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R. y Galán, J. E. (1998) *Cell* **93**, 815-826.
37. Patel, J. C. y Galán, J. E. (2006) *J. Cell Biol.* **175**, 453-463.
38. Alexander, E. H. y Hudson, M. C. (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 361-366.
39. Jonsson, K., Signäs, C., Müller, H. P. y Lindberg, M. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 1041-1048.
40. Sinha, B., Francois, P. P., Que, Y. A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., Lew, D., Krause, K. H., Peters G. y Herrmann, M. (2000) *Infect. Immun.* **68**, 6871-6878.
41. Schröder, A., Schröder, B., Roppenser, B., Linder, S., Sinha, B., Fassler, R. y Aepfelbscher, M. (2006) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5198-5210.
42. Kapetanovic, R., Nahori, M. A., Balloy, V., Fitting, C., Philpott, D. J., Cavillon, J. M. y Adib-Conquy, M. (2007) *Infect. Immun.* **75**, 830-837.
43. Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A. y Baizabal-Aguirre, V. M. (2007) *J. Infect.* **54**, 399-409.
44. Gómez, M., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., Cheung, A. y Prince, A. (2004) *Nat. Med.* **8**, 842-848.
45. Pimentel-Muinos, F. X. y Seed, B. (1999) *Immun.* **11**, 783-793.
46. Pober, J. S. (2002) *Arthritis Res.* **4**, S109-116.
47. Barnes, J. L., Williams, N. L. y Ketheesan, N. (2008) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 379-388.
48. Aggarwal, B. B. (2003) *Immunol.* **3**, 745-756.
49. Wajant, H., Pfizenmaier, K. y Scheurich, P. (2003) *Cell Death Differ.* **10**, 45-65.
50. McFarlane, S. M., Pashmi, G., Conell, MC., Littlejohn, A. F., Tucker, S. J., Vandenabeele, P. y MacEwan, D. J. (2002) *FEBS Lett.* **515**, 119-126.
51. Budd, R. C. (2002) *J. Clin. Invest.* **109**, 437-442.
52. DeMartin, R., Hoetch, M., Hofer-Warbinek, R. y Schmid, J. A. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, E83-88.
53. Madge, L. A. y Pober, J. S. (2001) *Exp. Mol. Pathol.* **70**, 317-325.
54. Bonizzi, G. y Karin, M. (2004) *Trends Immunol.* **25**, 280-288.
55. Hamill, R. J., Vann, J. M. y Proctor, R. A. (1986) *Infect. Immun.* **54**, 833-836.
56. Hippenstiel, S. y Suttorp, N. (2003) *Thromb. Haemost.* **89**, 18-24.
57. Cheung, A. L., Koomey, J. M., Lee, S., Jaffe, E. A. y Fischetti, V. A. (1991) *Infect. Immun.* **59**, 3827-3831.
58. Oviedo-Boyso, J., Barriga-Rivera, J. G., Valdez-Alarcón, J. J., Bravo-Patiño, A., Cárabez-Trejo, A., Cajero-Juárez, M. y Baizabal-Aguirre, V. M. (2008) *Scand. J. Immunol.* **67**, 169-176.
59. Oviedo-Boyso, J., Cardoso-Correa, B. I., Cajero-Juárez, M., Bravo-Patiño, A., Valdez-Alarcón, J. J. y Baizabal-Aguirre, V. M. (2008) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **54**, 53-59.
60. Matussek, A., Strindhall, J., Stara, L., Rohde, M., Geffers, R., Buer, J., Kihlström, E., Lindaren, P. E. y Löfgren, S. (2005) *Scand. J. Immunol.* **61**, 536-544.
61. Fournier, B. y Philpott, D. (2005) *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 521-540.
62. Gómez, M. I., O'Seaghdam M. y Prince, A. S. (2007) *EMBO J.* **26**, 701-709.
63. Gómez, M. I., O'Seaghda, M., Magargee, M., Foster, T. J. y Prince, A. S. (2006) *J. Biol. Chem.* **29**, 20190-20196.

Semblanza del Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre



El Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre es Químico Farmacobiólogo egresado de la Universidad Autónoma de Puebla. Obtuvo el grado de Doctor en Ciencias en el CINVESTAV-IPN (Campus Guanajuato) en la especialidad de Biotecnología de Plantas. Posteriormente, realizó una estancia post-doctoral en la División de Ciencias Biológicas y el Centro de Genética Molecular de la Universidad de California, San Diego, La Jolla, California, USA. Desde 2000 es Profesor Investigador del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. Ha dirigido 14 tesis de licenciatura, 2 de maestría y 3 de doctorado. Por su trayectoria y excelente trabajo en el área de patogénesis bacteriana recibió la Presea Morelos a la Excelencia por la mejor tesis del año (2006) y la distinción de Investigador Nacional Nivel II. Fue becario del Pew Latin American Fellows Program en Ciencias Biomédicas durante su estancia de investigación posdoctoral. El Dr. Baizabal se ha enfocado a entender los mecanismos de interacción entre bacterias patógenas y células animales, teniendo como modelo a *Staphylococcus aureus* y células endoteliales. Sus trabajos en esta línea de investigación se han publicado en revistas de reconocido prestigio internacional como *Journal of Infection*, *Scandinavian Journal of Immunology*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* y *FEMS Microbiology Letters*. El Dr. Baizabal tiene además una patente registrada sobre métodos para mejorar la tolerancia a la sequía en plantas. Ha sido aceptado por el Dr. Brett Finlay de la Universidad de British Columbia, uno de los líderes mundiales en patogénesis bacteriana, para realizar una estancia sabática a partir de septiembre de esta año (2009). Durante esta estancia, además de continuar con sus investigaciones sobre *S. aureus*, tratará de identificar algunos de los componentes celulares con los cuales interaccionan ciertos efectores de *Salmonella enterica*. Al Dr. Baizabal le gusta el ajedrez y es cinta negra en Aikido, arte marcial japonés que ha entrenado por más de 10 años.

La presente obra se terminó de imprimir el 3 de julio de 2009 en el Departamento de Impresos de la Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Interior de la Ciudad Universitaria, México D. F. 04510.

La impresión se hizo en papel Bond de 75 g/m² con pasta blanda.

La edición consta de 250 ejemplares más sobrantes para reposición.