



Facultad de Medicina



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



MENSAJE BIOQUÍMICO XLVII

Comité Editorial:

G. Hernández Alcántara

N. Meraz Cruz

L.H. Ramírez Silva

M.M. Vilchis Landeros

Vol. XLVII, 2023

© ISSN-0188-137X

Facultad de Medicina



DIRECTOR

Dr. Germán Fajardo Dolci

SECRETARIA GENERAL

Dra. Irene Durante Montiel

JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Dra. Teresita Corona Vázquez

JEFA DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN

Dra. Paz María Salazar Schettino

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN MÉDICA

Dr. Armando Ortiz Montalvo

SECRETARIO DEL H. CONSEJO TÉCNICO

Dr. Arturo Espinosa Velasco

SECRETARÍA DE SERVICIOS ESCOLARES

Dra. María de los Angeles Fernández Altuna

SECRETARIO ADMINISTRATIVO

Lic. Luis Arturo González Nava

SECRETARÍA JURÍDICA Y DE CONTROL ADMINISTRATIVO

Lic. Guadalupe Yasmín Aguilar Martínez

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

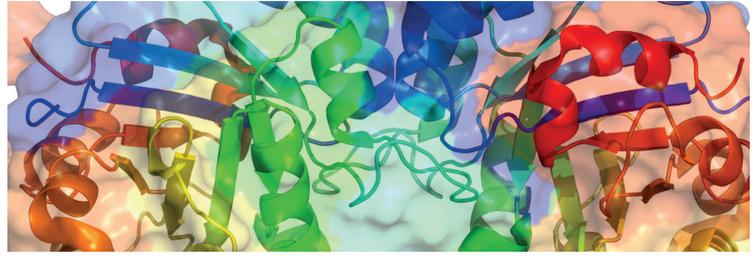
Dr. Federico Martínez Montes

MENSAJE BIOQUÍMICO COMITÉ EDITORIAL

Dra. Gloria Hernández Alcántara, Dra. Noemi Meraz Cruz, Dra. Leticia Haydé Ramírez Silva y Dra. María Magdalena Vilchis Landeros

MENSAJE BIOQUÍMICO es una revista académica arbitrada de publicación anual, editada por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Circuito Interior sin número, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CP 04510, México, Ciudad de México. Versión electrónica en < <http://biosensor.facmed.unam.mx/tab/>>. Indizada en revistas.unam.mx, LATINDEX y PERIÓDICA. Ni la Facultad de Medicina ni la UNAM son responsables por las opiniones vertidas por los autores. Se prohíbe la reproducción parcial o total del contenido sin previa autorización. Número de certificado de licitud de título: 5552. Número de licitud de contenido: 4295. Número de reserva al título de derechos de autor: 648-91.

Diseño y edición del Mensaje Bioquímico: Lic. Julieta Simón López y Lic. Karla Ivette López Ocampo del Departamento de Diseño Gráfico e Impresos de la Facultad de Medicina, UNAM.



CONTENIDO

Agradecimientos

Editorial

Cincuenta años del Taller de Actualización Bioquímica <i>Yolanda Saldaña Balmori</i>	6
Estudio inmunoproteómico de las alergias alimentarias en México <i>Horacio Reyes Vivas</i>	21
Las modificaciones postraduccionales de la trifosfato isomerasa de humano hacen un potencial objetivo farmacológico contra el cáncer <i>Sergio Enríquez Flores</i>	36
Fronteras en el diseño de proteínas <i>D. Alejandro Fernández Velasco</i>	47
Subtipo como herramienta potenciadora en análisis de asociación de genoma completo (GWAS) <i>Víctor Manuel Treviño Alvarado</i>	58
Perspectiva inmunológica en la estratificación del riesgo de parto pretérmino en mujeres saludables <i>Daniel Eduardo Sandoval Colín</i>	68
El papel de las proteínas de choque térmico en la homeostasis cardiovascular <i>Carlos Enrique Guerrero Beltrán</i>	81
Diseño y prueba de terapia génica con vectores adenovirales en tuberculosis experimental <i>Dulce Adriana Mata Espinosa</i>	91
El papel del microbioma en el desarrollo de la tuberculosis pulmonar <i>Eugenia Luisa Silva-Herzog Márquez</i>	103
La visualización de la transcriptómica espacial en tejidos: fundamentos y nuevos descubrimientos <i>Edna Ayerim Mandujó Tinoco</i>	112
Lo que el pez cebrá nos ha enseñado sobre el betaglicano, un misterioso co-receptor del <i>transforming growth factor beta</i> <i>Fernando López Casillas</i>	122
De constantes cinéticas, control metabólico y biología de sistemas <i>Juan Pablo Pardo Vázquez</i>	128
Enfermedad de McArdle: efecto de la creatina y coenzima Q10 sobre la actividad de la glucógeno fosforilasa muscular <i>Martha Elisa Vázquez Memije</i>	153
Coevolución mito-nuclear del reconocimiento de promotores en mamíferos <i>Angélica Zamudio Ochoa</i>	163
Problemática del tráfico ilícito del patrimonio cultural <i>Martha Isabel Tapia González</i>	175
Intrucciones para los autores / Instructions for authors	183



AGRADECIMIENTOS

La realización de este evento académico ha sido posible gracias al apoyo que nos ofrece la Facultad de Medicina de la UNAM a través de su Director, el **Dr. Germán Enrique Fajardo Dolci**, y de la Secretaria General, la **Dra. Irene Durante Montiel**; así como del Jefe del Departamento de Bioquímica, el **Dr. Federico Martínez Montes**.

Agradecemos a la **M. Liliana Garrido Gutiérrez**, Jefa del Departamento de Diseño Gráfico e Impresos de la Facultad de Medicina por todo su apoyo y a su equipo de trabajo, a la **Lic. en Comunicación Gráfica Julieta Simón López** por el diseño de la portada, carteles, constancias y banner del TAB 50; a la **Lic. en Diseño Gráfico Karla López** por el diseño de las libretas del TAB 50 y a ambas por la edición de los trabajos del Mensaje Bioquímico.

Dentro del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, queremos agradecer el apoyo del **L. C. Fernando Valentín Farfán Cabrera**, de la **L.C. Susana Marcela Dorantes Martínez**, de la **Sra. María Elena Vázquez Ramírez** y del personal administrativo que colabora con ellos. De igual modo, agradecemos a la **Sra. Haydeé Ibeth Calvo Ríos**, a la **Sra. María Enriqueta Cervantes González** y al **Sr. Juan García Gutiérrez** de quienes recibimos un apoyo incondicional en las diferentes etapas de la organización de este evento académico.

Por último, queremos agradecer a las empresas patrocinadoras por su donativo en libros de texto: **Wolters Kluwer** y **McGraw Hill**.

EL COMITÉ ORGANIZADOR TAB 2023

Dra. Gloria Hernández
Alcántara

Dra. Noemi Meraz
Cruz

Dra. Leticia Haydeé
Ramírez Silva

Dra. María Magdalena
Vilchis Landeros



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

EDITORIAL

Martínez Montes, Federico^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM.

*Correspondencia: Edificio D, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. UNAM, Avenida Universidad 3000 Circuito Exterior S/N, Col. Ciudad Universitaria, Coyoacán. CDMX (México), C.P. 04510. Tel. +52 (55) 5623-2168, fedem@bq.unam.mx

El proceso educativo en las áreas biológicas ha sido un reto constante ya que varios de los conceptos que los alumnos deben adquirir son abstractos y requieren de la ayuda de estrategias y herramientas que permitan comprenderlos para construir y fortalecer su formación académica. De la misma forma, los docentes deben actualizar sus conocimientos para transmitirlos de la mejor manera a los estudiantes.

Es claro que para los alumnos y los profesores es necesario mantener una constante actualización del conocimiento y del avance de la ciencia, de tal manera que se logre su adquisición y la incorporen tanto en su formación académica como en las actividades docentes y/o profesionales que así lo exigen.

De esta forma, el TAB surge como un instrumento que proporciona elementos teóricos y prácticos que les permiten a los asistentes actualizar y entender de una mejor manera algunos conceptos del área biológica asociados a las bases de la Bioquímica y la Biología Molecular, lo que contribuye a su formación académica y al mismo tiempo tener la capacidad de transmitir el conocimiento.

Celebrando los primeros 50 años del Taller, es necesario reconocer el trabajo que a través del tiempo han realizado un sinnúmero de académicos que con su entusiasmo y dedicación han logrado hacer de esta actividad un referente nacional que ha beneficiado tanto a profesores como estudiantes.

En esta ocasión, el Taller cubre una serie de temas que mantiene la calidad y profesionalismo de los Talleres anteriores.

- La **Dra. Saldaña** hace una reseña de la historia del Taller enfocando la atención a los inicios de éste y sobre las diferentes estrategias de las actividades que se implementaron para los asistentes.

- Sobre las alergias alimentarias, el **Dr. Reyes** mostrará la importancia de conocer, a través de los análisis inmunoproteómicos, el valor que tiene esta información en la toma de decisiones que contribuyan en un futuro no lejano a un mejor tratamiento de las personas que tiene este tipo de padecimientos.
- Otro tema de interés es el cáncer, en donde la actividad incrementada de la vía glucolítica ha permitido estudiar algunas enzimas que son claves como la trifosfato isomerasa, la cual presenta diferencias postrasduccionales entre las células sanas y las enfermas, lo que le ha permitido al **Dr. Enríquez** estudiar estas modificaciones como un posible modelo para el desarrollo de fármacos que contribuyan al tratamiento de los pacientes.
- Con relación a la estructura y función de las proteínas, el **Dr. Fernández** describirá las estrategias experimentales que se emplean en la actualidad para estudiar el plegamiento de las proteínas, incluso en modelos que por el momento no se han descrito en la naturaleza, gracias al avance de la Biología Molecular.
- **El Dr. Treviño** discernirá sobre la importancia de desarrollar nuevos métodos para identificar variantes de estudios de asociación del genoma completo en diferentes padecimientos y su relación con fenotipos específicos y variantes genéticas.
- Un tema relevante en salud reproductiva es que el embarazo llegue a término de manera exitosa. Sin embargo, en algunas personas el parto se presenta antes, lo cual es motivo de varios problemas tanto para la madre como para el bebé. Al respecto, el **Dr. Sandoval** presentará los avances del estudio que ha realizado para contar con marcadores inmunológicos que les permitan

predecir la posibilidad de un parto pretérmino y al mismo tiempo proporcionar elementos que le permitan al médico la toma de decisiones que favorezcan un parto sin complicaciones.

- Las proteínas de choque térmico tienen múltiples funciones, entre las cuales están efectos pre y pro-apoptóticos, participación en varias enfermedades y como moduladores de la respuesta inmune. El **Dr. Guerrero** mostrará los avances de los efectos de la HSP60 sobre los procesos inmunes y la respuesta inflamatoria y cómo su participación puede ayudar a mantener la salud o contribuir a su deterioro en ciertas enfermedades.
- Una de las enfermedades que más han causado problemas en su tratamiento es la tuberculosis, ya que implica la administración simultánea de al menos tres fármacos por tiempos prolongados. La **Dra. Mata** describirá el diseño de nuevos métodos que se basan en la inmunoterapia génica usando vectores adenovirales. Se pretende acortar el tiempo del tratamiento, coadyuvando con la antibioticoterapia convencional. Estos hallazgos permitirán establecer una alternativa en el tratamiento de este padecimiento.
- En este mismo sentido, el microbioma humano, que abarca todos los tejidos del organismo humano, tiene también un papel importante a nivel pulmonar. A este nivel, el microbioma interactúa con el sistema inmune para proteger de posibles patógenos. Sin embargo, durante la tuberculosis, la microbiota del paciente se ve modificada, lo cual será discutido por la **Dra. Silva-Herzog**.
- Las técnicas de secuenciación del DNA han mostrado que los linajes celulares muestran subpoblaciones, lo que ha permitido tener un mejor conocimiento en estudio del cáncer o la fisiología del cerebro, entre otros procesos biológicos. La **Dra. Mandujano** mostrará que con la técnica de transcriptómica espacial Visium se han identificado subpoblaciones que han contribuido a un mejor conocimiento en el estudio del cáncer y la cicatrización.
- Al betaglicano se le asignaron funciones moduladoras complejas. El estudio de este factor *in vivo* realizado por el **Dr. López** muestran que las actividades del betaglicano depende del contexto celular, modulando las respuestas asociadas al desarrollo y a la homeostasis, entre otras funciones celulares.
- El análisis de los parámetros cinéticos ha permitido conocer cómo es que las vías metabólicas se modulan. Sin embargo, el **Dr. Pardo** mostrará que, en una nueva forma de interpretación, la k_{cat}/K_m corresponde a la constante de velocidad de la captación del sustrato por una enzima para formar uno o varios complejos productivos. Con esta visión, discutirá cómo este tipo de análisis permite entender mejor el flujo de las vías metabólicas bajo ciertos contextos.
- La **Dra. Vázquez** discutirá sobre el papel de la carnitina

y la Coenzima Q10 en la actividad de la glucógeno fosforilasa *a* como una alternativa en el tratamiento de la enfermedad de McArdle. Los resultados que presentará muestran que la actividad de la enzima se ve favorecida por la carnitina y la Coenzima Q10, por lo que su administración a los pacientes con esta enfermedad podría contribuir a una mejoría a su estado de salud.

- Mantener una adecuada relación en el núcleo y las mitocondrias es fundamental en la vida celular. En este sentido, las interacciones entre las proteínas codificadas en el genoma nuclear y mitocondrial son relevantes. La **Dra. Zamudio** mostrará que existe una gran diversidad en los promotores mitocondriales, lo que a futuro le permitirá entender la evolución mitonuclear y especiación y cómo el reconocimiento del promotor les proporciona a las mitocondrias la plasticidad de la maquinaria transcripcional.
- El patrimonio cultural es una manifestación de la historia y valores de un pueblo que le da identidad. De ahí en interés de conservar todo lo relacionado a dicho patrimonio. Sin embargo, existe robo y saqueo, entre otros delitos, que minan el patrimonio de un país. La **Dra. Tapia** nos planteará aspectos legales para la protección y recuperan del material y cómo la participación de los restauradores es fundamental en la identificación y recuperación de los bienes muebles.

Es su conjunto, las ponencias permitirán discutir y actualizar los conocimientos sobre temas relevantes, algunos de ellos asociados a enfermedades que hasta el momento presentan problemas con el tratamiento. Por la calidad de los invitados, este Taller será todo un éxito.

Mayo, 2023



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 6-20

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Cincuenta años del Taller de Actualización Bioquímica.

Fifty years of the biochemical update workshop.

Saldaña Balmori, Yolanda^{1*}.

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

*Correspondencia. Avenida Universidad 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México C.U., Coyoacán, CDMX, CP 04510.

Tel: (+52)5513769098, (+52)5556846277, balmori@bq.unam.mx

Resumen

Hace 50 años el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, inició un programa orientado para apoyar a los profesores de Bioquímica de la República Mexicana, tanto en el contenido académico como en la parte pedagógica, esta actividad recibió el nombre de Taller de Actualización Bioquímica. La Universidad NACIONAL Autónoma de México en su nombre lleva un compromiso nacional, con esta labor académica, la Facultad de Medicina ha contribuido a que se cumpla en parte, ese compromiso, pues a través del tiempo son cientos de profesores provenientes de diferentes universidades de los distintos estados del País los que se han nutrido con el Taller. Esta actividad, que dependiendo de las necesidades en la época en las que se ha estado realizando y tomando en cuenta que son 50 años, ha tenido diferentes formatos ya sea, con la intervención activa de los participantes conducida por los ponentes, algunas veces con la realización de prácticas, otras con producción de material didáctico o bien, con asistencia a las conferencias. A los cinco años del primer Taller se inició la publicación de la revista anual llamada Mensaje Bioquímico que reúne el contenido de las ponencias que se habrán de presentar en el Taller de Actualización Bioquímica, desde su primer volumen en 1978, se ha entregado al principio de las actividades, la intención de esta entrega anticipada a los asistentes, es con la pretensión de que, con la lectura previa a las presentaciones, se pueda facilitar la comprensión de las ponencias

Palabras clave: Actualización bioquímica, apoyo a profesores, compromiso universitario.

Abstract

50 years ago the Biochemistry Department of the School of Medicine of the Universidad Nacional Autónoma de México, started a program aimed to support Biochemistry professors throughout the Mexican Republic, both in academic content and in the pedagogical part; this activity was called Taller de Actualización Bioquímica (Biochemistry Update Workshop). The NATIONAL Autonomous University of Mexico in its name carries a national commitment with the academical work, the School of Medicine has contributed to fulfill in part, that commitment, because over the years, there are hundreds of professors from different universities and different states who have been nourished with the Workshop. This activity, depending on the needs of each period in which it has existed, considering that they are already 50 years, has had different format either, with the active intervention of the participants led by the speakers, sometimes with the realization of practices, others with production of didactic material or just conference assistants. Five years after the first Workshop, the publication of the annual magazine called Mensaje Bioquímico (Biochemical Message) began, which brings together the content of the papers to be presented at the Biochemical Update Workshop, since its first volume in 1978; the intention of this advance delivery to the attendees is that with the previous reading of the presentations, the understanding of them can be facilitated.

Keywords: Biochemical update, support for teachers, university commitment.

Demografía en el país, en la Universidad Nacional Autónoma de México y en la Facultad de Medicina

En 1950 la población en la República Mexicana era de 25.8 millones; en 1960, de 36.3 millones; en 1970, de 50.3 millones y en 1980, de 67,7 millones, esto es, en 30 años la población en México aumentó 2.62 veces.

Hubo una explosión demográfica en el País, consecuentemente en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que en 1967 tenía 47,000 alumnos, pasó en 1972 a atender a 80,000 estudiantes. Ante este incremento de la población dentro de la Universidad el Rector Pablo González Casanova propuso la creación de nuevas edificaciones fuera del campus universitario y fue así que en 1974 en la UNAM se crearon las ENEP Cuautitlán, Iztacala y Acatlán y en 1975 las otras dos ENEP, Zaragoza y Aragón para poder contribuir en dar cabida a la población estudiantil. En las ENEP Iztacala y Zaragoza se impartió la carrera de medicina, lo que representó un desahogo para la situación que se estaba viendo en la Facultad de Medicina en Ciudad Universitaria. Dentro de este mismo contexto en 1974, se inician las funciones de tres Unidades de la Universidad Autónoma Metropolitana: Iztapalapa, Azcapotzalco y Xochimilco, lo que vino a constituir otra opción educativa a nivel superior en la Ciudad de México.

La inquietud de miles de jóvenes para acceder a las aulas universitarias, repercutió en la Facultad de Medicina, pues en 1971 tenía una población estudiantil de 14,447 y para 1976 llegó a 22,364; el número de alumnos de primer ingreso que regularmente aceptaba la Facultad en años anteriores era de cerca de 1,000 y en el año de 1974 se tuvo la cifra más alta ya que se admitieron a 5,376 estudiantes (1).

Formación didáctica en la UNAM

Una situación existente en la UNAM observada desde tiempo atrás, era que no se contaba con programas para la formación pedagógica de los profesores universitarios. En un principio hubo varias propuestas enfocadas a la formación y profesionalización de la docencia y fue en 1969 en el rectorado del Dr. Javier Barros Sierra que se cristalizaron esas inquietudes lográndose que se reestructuraran los programas de estudio por objetivos de aprendizaje y se crearan el Centro de Didáctica (CD) y un poco más adelante la Comisión de Nuevos Métodos de Enseñanza (CNME), en 1977 estas dos opciones de formación pedagógica se fusionan con algunas modificaciones para dar lugar al Centro de Investigaciones y Servicios Educativos (CISE) cuya finalidad fue que los profesores tuviesen una profesionalización de la docencia universitaria con una visión teórica-conceptual y de alguna manera uniendo la docencia con la investigación. Esto fue el proceso mediante el cual, independientemente de la formación de contenido académico en la disciplina que se enseñaba, era indispensable que el profesor adquiriera una formación teórica y metodológica para ejercer la práctica

docente con un enfoque didáctico; finalmente el CISE, que contribuyó en la formación pedagógica de miles de profesores, desapareció en 1997 (2).

Además, la UNAM en colaboración con la Organización Panamericana de la Salud y la Asociación de Universidades e Institutos de Educación Superior (ANUIES) en 1973, desarrolló el Centro Latinoamericano de Tecnología Educativa para la Salud (CLATES) y hacia 1980 el CLATES se deslinda de organismos externos y queda como Centro Universitario de Tecnología Educativa para la Salud (CEUTES) dependiente de la UNAM.

La pretensión general ante la creación de todas estas opciones dentro de la Universidad, era contar con profesores competentes en el campo de su disciplina, además, de tener una formación en el campo didáctico los cuales se adquirirían mediante talleres, cursos cortos que ayudaran al docente en el desarrollo de habilidades en la enseñanza, organización de sus contenidos, utilización de técnicas didácticas atractivas y convincentes, dominio grupal, enfoque ético e inquietud por una superación académica. La formación adquirida contribuyó en algunos casos, a que los profesores tuviéramos conciencia y el convencimiento de que nuestra función era la de ser formadores de personas, de futuros profesionistas.

Los estudiantes son el motivo principal para la existencia de las universidades y los docentes tienen el compromiso de contribuir a que ellos obtengan una buena formación. Para lograrlo, los profesores deben tener conocimientos, habilidades, estrategias educativas didácticas con una buena formación en el campo didáctico-pedagógico y una visión precisa de cuál es su papel en el desarrollo de personas que como profesionistas van a influir en la sociedad (3).

La materia de Bioquímica

La Bioquímica se impartía en el segundo año de la carrera de Medicina y en los años previos -como lo menciono arriba- la población era cercana a 1,000 estudiantes, la que estaba formada por alumnos que habían acreditado el primer año y los repetidores que era aproximadamente el 20%; se distribuía en 32 grupos de más o menos 30 alumnos. Debido al incremento poblacional que se dio en la Universidad hacia inicios de los años 70, la Facultad con su ingreso promedio de 5,000 estudiantes, hizo modificaciones que afectaron la organización, distribución de espacios, contratación de profesorado, etc.

En el Departamento de Bioquímica se duplicó el número de grupos, la materia dejó de ser anual para ser semestral y se hicieron un buen número de ajustes para poder atender a la gran cantidad de estudiantes, entre otras, se contrataron a profesores que no habían sido formados con los cánones del Dr. Laguna, ya que los que si nos habíamos formado bajo ese criterio, durante dos años seguidos antes de ser titulares de grupo, fuimos ayudantes de diferente profesor con la obligación de impartir un tema diferente en cada uno de los dos años y antes de la presentación en el salón de nuestras

clases, el contenido era discutido con el profesor titular del grupo, además, el día de la presentación el profesor estaba presente en el aula.

Los ajustes que se hicieron para atender adecuadamente a los alumnos inscritos, repercutieron en el rendimiento en general de la población ya que se redujeron tanto el número total de horas dedicados a la materia, así como en número de prácticas pues la materia es teórica-práctica; de esta manera los alumnos no tuvieron las mismas oportunidades de formación que los de las generaciones anteriores.

Lo que ocurría en el Departamento, ocurría en la Facultad y en toda la Universidad, en esa temporada hubo un cierto desprestigio de la UNAM debido a la formación que estaba dando a sus estudiantes.

El Departamento de Bioquímica

Las actividades de organización de grupos, distribución de profesores, elaboración de exámenes y el resto de actividades relacionadas con la enseñanza, desde el inicio del Departamento en 1957, fueron atendidas y dirigidas por el Jefe de Departamento el Dr. José Laguna García (Fig. 1) con la colaboración muy estrecha del Dr. Jesús Guzmán García;



Figura 1. El Dr. José Laguna García, Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM de 1957 a 1971.

ante las múltiples actividades que debían de atender relacionadas con los diferentes proyectos de investigación existentes, funciones administrativas, publicaciones, donativos, acuerdos con las autoridades, etc. en 1969, el Dr. Laguna designó a tres profesores Guillermo Álvarez Llera, Magdalena Carrillo Santín y quien suscribe este documento Yolanda Saldaña Balmori para asumir estas funciones y con ello quedó constituida la Sección de Enseñanza del Departamento. El Dr. Laguna en 1971 fue designado Director de la Facultad y como Jefe del Departamento quedó el Dr. Enrique Piña Garza (Fig. 2).

Durante casi 10 años los integrantes de este grupo nos dedicamos a la revisión de los contenidos del programa de la materia, organización de las plantillas de profesores, elaboración de exámenes tanto departamentales que eran

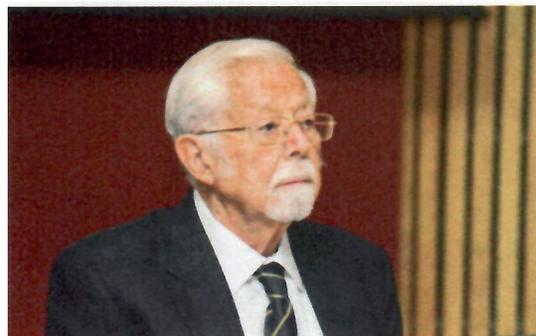


Figura 2. El Dr. Enrique Piña Garza, Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM en varios periodos, en el primero de ellos se inició el Taller de Actualización Bioquímica.

trimestrales, como los extraordinarios -en esa época, la modalidad era aplicar uno cada mes-, la atención de los problemas relacionados con el estudiantado y la producción de material didáctico con el formato de unidades de auto-enseñanza. Se elaboraron 9 unidades de este tipo, la mayoría de ellas fueron encabezadas por profesores del Departamento con la colaboración de estudiantes incorporados al mismo como instructores. Las unidades que se produjeron fueron: 1. En la unidad de “Agua y electrolitos” dirigida por el profesor Gonzalo Cinco Espinoza, contribuyeron Silvia Jiménez Thomas, Carlos Chávez Villavicencio y Josué Garza Flores; 2. La unidad de “Energía” encabezada por el Dr. Enrique Piña Garza intervinieron Rocío Orozco Topete, Cristina Saldate Alonso y el Dr. Eduardo Piña Garza; 3. La profesora Magdalena Carrillo Santín invitó a participar en la unidad de “Genética” a Gustavo González Bonilla, a Jorge Pruneda y a Eduardo Castellanos; 4. Con el profesor Jorge Soria Díaz Infante en la elaboración de “Hipoglicemia” participaron Vicente Díaz Sánchez y Roberto García Loaiza; 5. “Integración y regulación del metabolismo” suscrita por los profesores de la Sección de Enseñanza: Guillermo Álvarez Llera, Magdalena Carrillo Santín y Yolanda Saldaña Balmori; 6. “La nutrición” encabezada por el profesor Guillermo Álvarez Llera contó con la colaboración de Sara Morales López; 7. “Obesidad” encabezada por la que suscribe Yolanda Saldaña Balmori con la participación de Silvia Jiménez Thomas y Sara Morales López; 8. “Oxidaciones biológicas y bioenergética” encabezada por el profesor Guillermo Álvarez Llera, tuvo la contribución de Josué Garza Flores; y 9. “Regulación hormonal del metabolismo” nuevamente suscrita por los profesores Guillermo Álvarez Llera, Magdalena Carrillo Santín y Yolanda Saldaña Balmori.

A partir de lo arriba mencionado, en relación con la formación didáctica de los profesores al pretender la profesionalización de la enseñanza, en el Departamento de Bioquímica se dieron los primeros pasos: los tres participantes de la Sección de Enseñanza en 1972 tuvimos la oportunidad de asistir a un Taller de Didáctica y a un Seminario de Actualización Didáctica -este último con duración de tres días de trabajo-,

ambos impartidos por el personal de la Comisión de Nuevos Métodos de Enseñanza.

De agosto de 1973 a marzo de 1974 los miembros de la sección de Enseñanza, llevamos el curso -8 horas a la semana- "Didáctica para la formación de profesores de Bioquímica" impartido por profesores del Centro de Didáctica, en él pudimos sumergirnos en metodologías, filosofía de la enseñanza y técnicas didácticas, fue así utilizando que los recursos aprendidos, pudimos planear actividades dedicadas a mejorar la parte pedagógica de los profesores del Departamento, las que sumadas a las necesidades de contenido académico, acabó dando lugar al Taller de Actualización Bioquímica (Fig. 3).

Todo esto lo he querido mencionar debido a que, eso fue la piedra angular para que al tener varias pláticas con el Jefe de Departamento el Dr. Piña, en 1973 en torno a los problemas relacionados con el proceso enseñanza-aprendizaje por el incremento en la población escolar que teníamos, ya que

persona, ya que relataré mis experiencias vividas durante la organización y desarrollo de los primeros 14 años del Taller de Actualización Bioquímica (a excepción del tercero) y el trabajo editorial de 10 volúmenes de Mensaje Bioquímico que después de un intervalo de 4 años, tuve la responsabilidad por 2 años más.

El inicio del Taller

En una junta hacia mediados del año 1973, que tuvimos los participantes de la Sección de Enseñanza con el Dr. Piña, discutimos principalmente acerca de la deserción estudiantil que estábamos teniendo y del alto índice de reprobación, quizá por la posible falta de profundidad en la presentación de algunos temas debido a la improvisación de profesores. Fue entonces que el Dr. Guillermo Álvarez propuso que se organizara una serie de pláticas y con las opiniones de los participantes de la reunión, se enriqueció la idea y finalmente se concretó que fuera un ciclo de conferencias con la duración de una semana, para lo cual invitaríamos a profesores expertos en los diferentes temas a que nos compartieran los avances más recientes de algunos tópicos de nuestra materia en lo que ellos estaban inmersos. Ahondando en la idea, se pensó en invitar a los profesores de diferentes espacios académicos que sabíamos estaban en una situación semejante, tal era el caso de las Facultades de Química, Medicina Veterinaria y Ciencias en la UNAM y a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Yo estudié la licenciatura en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y a pesar de que ya tenía varios años en el Departamento de Bioquímica, mantenía una relación muy estrecha con algunos profesores de las escuelas de Medicina y Química de mi Universidad y sabía que también ellos estaban, en condiciones semejantes, se me ocurrió la idea de proponerle al Dr. Piña que invitáramos a los profesores de Bioquímica de San Luis, el Dr. Piña se quedó pensando un momento y me dijo: "Si quiere invitar a sus paisanos, hágalo, pero tiene que invitar a los profesores de Bioquímica del País" yo me quedé helada pues el compromiso era descomunal, pero aun sin saber lo que ello implicaba, ni comprender la dimensión y trascendencia del proceso, acepté el reto.

Aunque la UNAM ya tenía algunos años en Ciudad Universitaria no contaba en 1973 con alguna dependencia que me apoyara en mi búsqueda, pues fue hasta 1978 que con el rectorado del Dr. Guillermo Soberón que se creó la Dirección General de Intercambio Académico y que al frente estuvo la Lic. María de los Ángeles Knochenhauer. Fue así que al cabo de pensar durante unos días de cómo le iba a hacer para saber dónde había universidades en la República en las que hubiera carreras en donde en su plan curricular estuviera incluida la materia de Bioquímica, posiblemente con la sugerencia de alguien, opté por recurrir a la única organización que podría darme esa información y así, fui a las oficinas de la Unión de Universidades de América Latina (UDUAL), que estaban alojadas en un espacio dentro de la UNAM, les expliqué todo

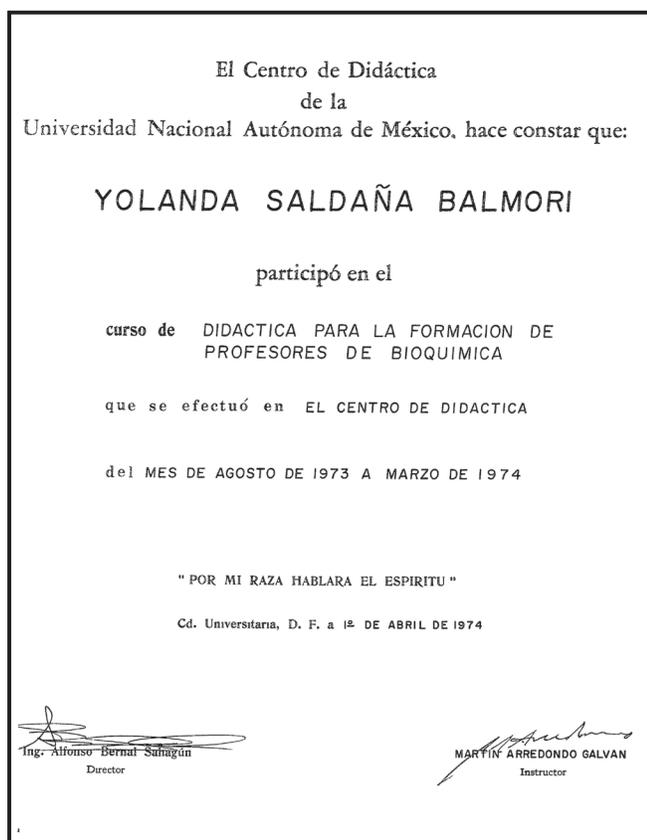


Figura 3. Documento a favor de Yolanda Saldaña Balmori como participante de una de las primeras actividades formativas del Centro de Didáctica.

como ya lo mencioné, en lugar de los aproximadamente 1,000 alumnos que acostumbraban ingresar en los años anteriores, ahora atendíamos a 5 veces más, se buscara una forma de resolver la situación que se estaba viviendo en el proceso enseñanza-aprendizaje dentro del Departamento.

En adelante, en muchas ocasiones me referiré en primera

lo que necesitaba saber y me permitieron acceder a su acervo que afortunadamente estaba actualizado.

Empecé a anotar estado por estado: nombre de las universidades, ciudades, domicilios, nombre del rector de cada una de ellas, nombre de las escuelas de orden biológico, nombre -si lo había- de los directores de las escuelas de Medicina, Química, Biología, Medicina Veterinaria y Nutrición. Esta labor me llevó tres mañanas enteras, ya con toda esa información, el Dr. Piña dispuso que la Sra. Elisa Mora, una secretaria del Departamento, armara un directorio con esos datos.

Es importante mencionar que, en 1973 no se tenían los recursos tecnológicos actuales, el sistema de impresión y fotocopiado era pésimo, el trabajo secretarial era teclado en máquinas de escribir, la mejor forma de comunicarnos con personas de otras ciudades era el correo postal ya que el teléfono de larga distancia era muy deficiente y caro, y una serie de limitaciones que en ese tiempo no éramos conscientes de ellas.

La Comisión Organizadora del Taller de Actualización Bioquímica (TAB) quedó constituida por los doctores Enrique Piña Garza, Ricardo Tapia Ibaranguoitia, Yolanda Saldaña Balmori, Magdalena Carrillo Santín y Guillermo Álvarez Llera; poco a poco se fue armando el proyecto, enviamos una primera carta dirigida -en la mayoría de los casos- a los rectores pidiéndoles que comunicaran a sus directores de escuelas y ellos a su vez, a sus profesores de Bioquímica, que los invitáramos a asistir durante la semana comprendida del 25 al 29 de marzo del siguiente año, a un Taller en el que investigadores o profesores expertos actualizarían algunos temas de Bioquímica.

Poco a poco fueron llegando las respuestas tanto de algunos directores de escuelas universitarias, en donde nos daban los nombres de aquellos profesores elegidos para asistir, así como las de algunos profesores interesados.

Como lo mencioné antes, en esa temporada en los años 1973-1974, fue cuando los miembros de la Sección de Enseñanza del Departamento llevamos un curso en el Centro de Didáctica y con la ayuda del Instructor del curso el Maestro Martín Arredondo Galván, se elaboró el formato del programa en donde, en cada uno de los 5 días a trabajar habría tres ponencias, dos por la mañana y una por la tarde, además en cada día, se presentaría un tema relacionado con la Didáctica, ya que una de las pretensiones de la reunión, era incorporar el empleo de técnicas pedagógicas a nuestro ejercicio docente.

Al mismo tiempo quedó redactado el objetivo del Taller de Actualización Bioquímica en estos términos: "Ofrecer a los profesores de Bioquímica un mecanismo de actualización en los conocimientos de su área, así como en la sistematización y en la tecnología de la enseñanza mediante el intercambio de la experiencia y puntos de vista entre los miembros del personal académico de diversos centros de Educación Superior en la República Mexicana".

Acerca de las ponencias de contenido bioquímico, cada

sesión debería durar 2 horas 15 minutos, ese tiempo se distribuyó en tres porciones: durante la primera parte, el expositor debería hacer su presentación, en el segundo tercio la población asistente se distribuiría en grupos de 6 personas para discutir el contenido y aprendizaje de la misma y en el tercer tramo, un representante de cada uno de los grupos debería poner en común lo trabajado en cada uno de los grupos; el planteamiento era que cada uno de todos los asistentes, tuviéramos una participación activa, efectivamente un verdadero TALLER.

Se realizaron todos los preparativos y se inició la reunión en una de las aulas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, gracias a la participación de profesores de distintas universidades del País la reunión fue todo un éxito, ya que contamos con la asistencia de 64 profesores: 22 de ellos provenientes de 13 universidades del interior del País: Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Durango, Estado de México, Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Veracruz, Yucatán y Zacatecas, asistieron 2 profesoras provenientes de Guatemala y 40 profesores de la Ciudad de México, donde la mayoría éramos del Departamento de Bioquímica pues el Jefe, consideró que nuestra asistencia era obligatorio ya que originalmente esta actividad se pensó para resolver los problemas de falta de actualización en algunos de nuestros profesores ya que era indispensable reforzar algunos temas. De las otras dependencias de la UNAM, estuvieron participando algunos profesores de las Facultades de Química, Medicina Veterinaria, Odontología y Ciencias, los profesores de las otras instituciones de la Ciudad de México que participaron fueron provenientes de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y de la Universidad Femenina de México (Fig. 4)

Durante los cinco días las actividades se realizaron conforme al programa elaborado, la inauguración estuvo a cargo del Director de la Facultad el Dr. José Laguna y la clausura la realizó el Jefe de Departamento, el Dr. Enrique Piña. La participación, comunicación e integración entre los participantes fue muy enriquecedora, expresaban su satisfacción por la iniciativa que había tomado el Departamento de Bioquímica; de esta manera la UNAM a través de la Facultad de Medicina, estaba contribuyendo a la formación de profesores de nuestra disciplina provenientes de algunas universidades del interior del País.

Ya en la tarde del viernes, un grupo de profesores de Torreón, Saltillo, Monterrey y Hermosillo, nos dijeron que habían decidido hacer un plantón y que no se irían del aula donde estábamos trabajando hasta que les prometiéramos que los convocaríamos al año siguiente.

La organización de Taller que se estaba realizando, nos había ocupado a algunos, seis meses de trabajo, tiempo en el que habíamos descuidado otros compromisos dentro el Departamento y lo habíamos considerado como un evento único, por tal razón ese Taller no tenía número, era sólo Taller de Actualización Bioquímica. Ante una pequeña discusión acerca de los beneficios que esa convocatoria representaba

TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA		DEL 25 AL 29 DE MARZO DE 1974	
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO			
<p>Lunes 25 de Marzo 8 00 a 9 00 9 00 a 9 15 9 15 a 11 30 11 30 a 11 45 11 45 a 14 00 16 00 a 18 00 18 00 a 18 30</p> <p>Martes 26 de Marzo 9 00 a 11 15 11 15 a 11 30 11 30 a 13 45 16 00 a 18 00 18 00 a 18 30</p> <p>Miércoles 27 de Marzo 9 00 a 11 15 11 15 a 11 30 11 30 a 13 45 16 00 a 18 00 18 00 a 18 30</p>	<p>Inscripción Aula 3-C Facultad de Medicina U N A M Introducción La enseñanza de la Bioquímica en las Carreras de Químico-Biólogas Dr. José Laguna C., Director de la Facultad de Medicina, U N A M Integración de grupos de trabajo Psicólogo Rafael Reyesdas Centro de Didáctica, U N A M Desayuno Metabolismo Intermedio y Bioenergética Dr. Antonio Peña D. Depto. de Biología Experimental, Instituto de Biología, U N A M Quilificación Biológicos y Bioenergética Dra. Marietta Tuena S y Dr. Edmundo Chávez Depto. de Biología Experimental, Instituto de Biología, U N A M Didáctica Aspectos Motivacionales del Aprendizaje Sección de Enseñanza del Depto. de Bioquímica Facultad de Medicina, U N A M</p> <p>Estructura de Proteínas Dr. Marcos Reynold M. Depto. de Genética, --- C E I A / del I P N Desayuno Propiedades de las Proteínas Dr. Angel Arroyo B., Depto. de Biología Experimental, Instituto de Biología, U N A M Lipoproteínas Plasmáticas Dr. Pablo Rivera H. Jefe del Laboratorio de Análisis Clínicos Hospital de La Base del I H S S Didáctica Objetivos de Enseñanza-Aprendizaje Dr. Guillermo Álvarez L., Coordinador de Enseñanza, Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, U N A M</p> <p>Membranas Biológicas Dr. Sergio Estrada O y Dr. Carlos Gómez Lojero Depto. de Bioquímica, C E I A del I P N Desayuno Hormonas, AMP Cíclico y Metabolismo Intermedio Dra. Victoria Ch. de Sánchez Depto. de Biología Experimental, Instituto de Biología, U N A M Síntesis de Proteínas Dr. Alberto Huberman Jefe del Depto. de Bioquímica Hospital de Enfermedades de la Nutrición Didáctica Procedimientos y Recursos de Enseñanza Quia Magdalena Carrillo, Sección de Enseñanza, Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, U N A M</p>	<p>Jueves 28 de Marzo 9 00 a 11 15 11 15 a 11 30 11 30 a 13 45 16 00 a 18 00 18 00 a 18 30</p> <p>Viernes 29 de Marzo 9 00 a 11 15 11 15 a 11 30 11 30 a 13 45 16 00 a 18 00 18 00 a 18 30 18 30 a 18 45 18 45</p> <p>Capo Limitado</p>	<p>Metabolismo y Función de Macromoléculas Dr. Rafael Palacios de la I. Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U N A M Desayuno Organelos Citoplásmicos Dra. Aurora Herrería L. Depto. de Biología Experimental, Instituto de Biología, U N A M Diferenciación Celular Regulación de la Transcripción y la Traducción de la Información Genética Dr. Mario Castañeda Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U N A M Didáctica Evaluación del Proceso Enseñanza-Aprendizaje O F B Yolanda Saldaña B. Sección de Enseñanza, Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, U N A M</p> <p>Neuroquímica Dr. Ricardo Tapia Jefe del Departamento de Biología Experimental, Instituto de Biología, U N A M Desayuno Nutrición contra Desnutrición Dr. Hector Burger, Div. de Nutrición, Inst. Nal. de Enfermedades de la Nutrición Las Prácticas de Laboratorio en la Enseñanza de la Bioquímica Dr. Gilberto Brás V. Coordinador de Prácticas, Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, U N A M Didáctica Planeación Sección de Enseñanza del Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, U N A M Clausura Dr. Enrique Piña Jefe del Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina, U N A M Branche</p>

Figura 4. Programa del Taller de Actualización Bioquímica, realizado del 25 al 29 de marzo de 1974 en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

para los asistentes, el Dr. Enrique Piña acabó aceptando de que los llamaríamos al año siguiente. Debido a esa petición se realizó el II TAB con la decidida intervención de la Facultad de Medicina y en años posteriores con el apoyo de profesores e instituciones que durante varios años nos recibieron en sus espacios universitarios en diferentes estados de la República, sumado al interés de los participantes y al aumento en la asistencia, el Taller se ha podido realizar ininterrumpidamente desde 1974 a la fecha, lo que ha permitido que miles de profesores y alumnos de pre- y posgrado refuercen o adquieran su conocimiento en algunos temas de frontera en el área de la bioquímica y disciplinas afines (4), ahora al cumplirse 50 años de haberlos llamado por primera vez, es notorio que nuestro Departamento ha cumplido con el compromiso académico que queda implícito en el nombre de la Universidad NACIONAL Autónoma de México que tiene con el resto de las instituciones de enseñanza superior del País.

II, III y IV Talleres de Actualización Bioquímica

El II Taller de Actualización Bioquímica también se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Bioquímica del 4 al 8 de agosto de 1975, el Comité Organizador fuimos J Soria Díaz Infante, Y Saldaña de Delgadillo, F Fernández Gavarrón, M Carrillo Santín y G Álvarez Llera. El Dr. Laguna realizó la inauguración y la clausura la hizo el Jefe de Departamento el Dr. Jorge Soria Díaz-Infante; en este Taller se abordaron los siguientes temas: “Biosíntesis de virus” por el Dr. Luis Enrique Sánchez; “Nutrición” presentado por el Dr. Carlos Casas Campillo, “Efecto de Hormonas proteicas en el metabolismo celular” por el Dr. José Solís; “Regulación de la calcemia” por el Dr. Federico Fernández; “Análisis clínicos” con el Dr. Roberto Pérez; “La medición del agua total con agua tritiada como ejemplo del empleo

de sustancias radiactivas” por el Dr. Peter L. Eberstadt; “Radioinmunoanálisis” por el Dr. Jorge Soria; “Membranas: estructura, composición y función” por el Dr. Alfonso Cárabez; “Reacción inmunológica en el modelo actual de membrana” por la Dra. Magdalena Fresán; “Lípidos en la clínica” por el Dr. Eduardo Zorrilla; “Didáctica, experiencia de tres grupos piloto con enseñanza programada” por los Dres. Magdalena Carrillo, Yolanda Saldaña y Guillermo Álvarez e ”Ingeniería Genética” por el Dr. Guillermo Carvajal.

El III Taller se realizó en la Ciudad de México del 25 al 29 de octubre de 1976, el Dr. Jorge Soria Díaz-Infante, invitó a los Dres. Juan Cuauhtémoc Díaz Zagoya y Octavio Robinson a que lo organizaran. En esta ocasión se programó que, en las tardes, pequeños grupos de los profesores del interior de la República realizaran unas prácticas con algunos investigadores de diferentes sitios de la ciudad. El eje central de los temas que abordaron los diferentes doctores, fue alrededor de las membranas, así: “La bicapa lipídica como base estructural de la membrana biológica” fue desarrollado por Mario Philipp; “Organización supramolecular de la membrana y la superficie celular” por Adolfo Martínez Palomo; “El transporte a través de membranas biológicas” por Carlos Gómez Lojero; “Las membranas mitocondriales y oo la compartimentalización” por Armando Gómez Puyou y Marietta Tuena Sangri; “La recepción del antígeno en la respuesta inmune” por Carlos Larralde; “Receptores y dinámica de membrana de macrófagos” con Jesús Calderón; “Caracterización y función de la inmunoglobulina de la membrana de linfocitos” por Erika Abney; “Planeación académica integral” por Enrique Villarreal; “Patología de membranas” por José de Jesús Manrique; “Las enzimas asociadas a la membrana de músculo cardiaco” con Edmundo Calva Cuadrilla y Rosario Núñez; “Introducción a la didáctica” por Jesús Berruezo; “Sistematización del curso de Bioquímica en la Facultad de

Medicina” con Guillermo Álvarez, Magdalena Carrillo y Yolanda Saldaña; “Enfermedades genéticas con participación de la membrana celular” por Susana Ramírez; “Relación entre la edad gestacional y fosfolípidos del líquido amniótico” por Jorge Soria. Las 5 prácticas que se realizaron fueron: “Microscopía electrónica” con Adolfo Martínez Palomo; “Los métodos inmunoquímicos aplicados al laboratorio clínico” con Pablo Rivera; “Curva de precipitación antígeno-anticuerpo y titulación, empleando antígenos marcados con I-125” con Erika Abney; “Identificación de fosfolípidos en membranas de glóbulos rojos” con Ricardo Martínez y “Valoración hormonal por radioinmunoensayo” con personal del Hospital de Ginecoobstetricia # 1 del IMSS. Además, hubo dos sesiones de experiencia didáctica relacionadas con estos cuatro temas: “La enseñanza en la ENEP Iztacala”, “La enseñanza en la Facultad de Ciencias en Xalapa, Veracruz”, “El empleo de la lectura veloz en la comprensión de la Bioquímica” y “Los modelos para auto-enseñanza de macromoléculas IgG y polipéptidos”.

El IV TAB, también se realizó en las instalaciones de la Facultad de Medicina en Ciudad Universitaria del 5 al 9 de septiembre de 1977, el equipo organizador lo constituimos: E Piña Garza, Y Saldaña Balmori, G Álvarez Llera, M Carrillo Santín y F Fernández Gavarrón; la inauguración la hizo el entonces Director de la Facultad el Dr. Octavio Rivero Serrano. Los temas de contenido bioquímico que trataron los diferentes doctores fueron: “Alucinógenos en Bioquímica” por Ricardo Tapia; “Análogos de nucleósidos y sus usos” con Rogelio Maldonado; “Química de proteínas” por Alberto Hamabata; “Mecanismo de acción de hormonas” por Bulmaro Valdéz y Arnulfo Albores; “Metabolismo del calcio” por Federico Fernández; “Utilización de computadoras en Bioquímica” con Alfredo Delgado; “Compartimentalización celular” por Adolfo García Sainz; “Ecología molecular” por Juan José Martínez; “Bioquímica de la división celular” por José Luis Muñoz; “Bioquímica de venenos de animales ponzoñosos” con Lourival Possani y Alejandro Alagón, además de “Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa” por Blas Lotina. Los temas de aspecto pedagógico que presentaron los diferentes licenciados fueron “Programa de especialización en docencia” por Martín Arredondo Galván; “Aspectos psicopedagógicos en la docencia” con Graciela Pérez Rivera; “Aspectos sociopedagógicos de la docencia” por Teresa West Silva; “Aspectos tecnopedagógicos de la docencia” por Ma. Esther Aguirre Lora, todos ellos, del Centro de Didáctica, UNAM.

Es importante observar que la participación de profesores de las diferentes universidades en esta actividad iba en ascenso, en esta ocasión invitamos como ponentes a los doctores Bulmaro Valdéz y Arnulfo Albores de la Universidad Autónoma de Coahuila, al Dr. Alfredo Delgado de la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Dr. Juan José Martínez de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Pudiera parecer prolijo el enlistado de los temas presentados en los Talleres II, III y IV, pero es la única forma de

conservar esta información ya que, a partir del V Taller, tanto la programación como el contenido de todos los temas trabajados, se integraron como capítulos en el correspondiente volumen de Mensaje Bioquímico.

Antecedentes del Mensaje Bioquímico

Cuando estábamos organizando en 1974 el Taller de Actualización Bioquímica, les pedimos a los ponentes que nos proporcionaran una cita bibliográfica que fuera central de su presentación, algunos nos la dieron, las incluimos en una hoja junto con el programa de actividades, aunque consideramos que no fueron de utilidad para muchos de los asistentes ya que en ese tiempo la mayoría de las bibliotecas no tenían las colecciones de revistas científicas como las que ahora existen.

Para el II TAB consideramos que, si se entregaba una copia del artículo eje de las diferentes ponencias, sería un punto de apoyo para los profesores asistentes una vez que estuvieran en sus respectivas universidades. En 1975 el recurso disponible para multiplicar un documento era utilizando el mimeógrafo, cuando reproducimos los documentos entregados por los ponentes, quedaron de tan mala calidad que eran prácticamente ilegibles, máxime que estaban en inglés. Nuevamente consideramos que eran de poca utilidad estos materiales.

El enriquecimiento de las bibliotecas -incluso las de la UNAM- con la existencia de colecciones de revistas científicas fue un proceso paulatino y en los años 70 y 80 del siglo pasado era muy deficiente; lo que se acostumbraba era que el investigador revisara en el Current Content las publicaciones de su interés y enviara al autor por correo postal, la solicitud de un sobretiro de su publicación, regularmente tardaban semanas y a veces meses en llegar el documento solicitado, de tal suerte que una vez que se tenía en las manos, era un objeto muy apreciado, así en 1976 para el III TAB, la solicitud que se hizo a los ponentes, fue que prestaran a los organizadores el sobretiro fundamental de su plática para reproducirlo, en esa ocasión se corrió con un poquito de mejor suerte.

Para el IV TAB, nuestra estrategia cambió, les pedimos a los profesores invitados a participar como ponentes que escribieran un documento de unas 3 a 5 cuartillas con lo medular de su ponencia, de igual manera, las reproducimos y entregamos a cada uno de los asistentes un paquete con el contenido de ellas.

Mensaje Bioquímico

Dentro del proceso natural de la evolución, lo ya adquirido sirve como base para la siguiente etapa; fue así que en 1978 les pedimos a los profesores invitados a participar como ponentes en el V TAB que escribieran un texto de 15 a 25 cuartillas de lo que sería su presentación y que nos lo entregaran con 6 meses de anticipación a las fechas de la reunión ya que se realizaría el trabajo editorial correspondiente y reuniríamos

todo el material para publicarlo en el primer volumen de la colección Mensaje Bioquímico.

Todos los profesores invitados a ser ponentes entregaron el material en tiempo y forma, realizamos el trabajo editorial, sugerimos en ocasiones algunos cambios de redacción, los trabajos se teclearon con un mismo formato y el volumen se imprimió en la imprenta de la Facultad de Medicina. Algo fundamental fue que en la inauguración del Taller se les entregó a los asistentes el primer ejemplar de la colección Mensaje Bioquímico. El compromiso que los asistentes al Taller debieran cumplir, era que antes de que iniciara cada una de las ponencias, deberían haber leído el capítulo correspondiente inserto en el Mensaje Bioquímico, todo con la intención de que antes de escuchar la plática estuvieran enterados de su contenido, creemos que con esa estrategia en muchos de los casos se ha cumplido con el objetivo y ha habido un mejor aprovechamiento.

En el párrafo siguiente incluyo parte del Prólogo de este primer Mensaje Bioquímico (Y Saldaña, G Álvarez y E Piña, Eds.) (5).

“Esta obra contiene los trabajos que se presentarán en el V Taller de Actualización Bioquímica, con sede en la Universidad Autónoma de Coahuila, así como una pequeña historia de los 4 Talleres anteriores. Se trata de un documento de trabajo que se llevó a cabo debido a la excelente colaboración de todos y cada uno de los ponentes en el Taller, a quienes manifestamos nuestra cordial gratitud. Se pretende que sea útil, tanto para su consulta durante el Taller, como por varios años, en la preparación que alumnos y profesores debemos de realizar al participar en clase, en los temas aquí tocados. Los temas seleccionados son tan diversos como la Bioquímica actual, el punto de unión entre todos los asistentes al Taller, ponentes y oyentes activos, es nuestra participación en la enseñanza de la Bioquímica (a nivel nacional) y nuestro genuino interés por mejorar el acto docente, así como de facilitar el aprendizaje a nuestros alumnos. Seleccionamos como título de la obra el de MENSAJE BIOQUÍMICO porque en muchos aspectos anhelamos que este documento, junto con otros similares que esperamos ofrecer como fruto de nuestros Talleres, sea un verdadero mensaje ...”

Con todo este proceso evolutivo queda claro de porqué en este año que se cumplen cincuenta años del Taller, se tiene al volumen cuarenta y siete del Mensaje Bioquímico (Fig. 5).

El Taller itinerante

El Dr. Bulmaro Valdez, a principios de 1978 ofreció en nombre de la Universidad Autónoma de Coahuila, colaborar con nuestro Departamento de Bioquímica para que el V Taller se realizara en aquel Estado. Por gestiones realizadas por la Universidad sede ante la Dirección General de Investigación Científica y Superación Académica de la Sub-Secretaría de Educación Superior e Investigación Científica, dependiente de la Secretaría de Educación Pública (SEP), que en esos años,

apoyaba económicamente a las universidades del interior de la República para la realización de eventos como el nuestro, además del apoyo de la Universidad Autónoma de Coahuila, se pudieron sufragar los gastos de transporte y alojamiento de los profesores participantes como ponentes y del equipo de trabajo para que durante la semana comprendida del 25 al 29 de septiembre estuviéramos trabajando en un hotel campestre, “El rincón del montero” en Parras de la Fuente, Coah.

Con este Taller realizado fuera de la Ciudad de México y siempre contando con el apoyo que solicitaba la Universidad sede a la Dirección General de Investigación Científica y Superación Académica de la SEP, se inició una temporada que duró de 10 a 12 años en la que el TAB se realizó en universidades del interior del País, lo que fortificó que se incrementaron las relaciones humanas entre los profesores participantes o bien entre los participantes y ponentes al Taller ya que como regularmente estábamos alojados en el mismo hotel, se tuvo la oportunidad de sentarse a comer y a conversar a veces con los ponentes, gracias a ello, hubo varios casos de profesores de universidades del interior que pudieron completar su formación realizando un posgrado en alguna de las instituciones de la Ciudad de México.

El VI Taller de Actualización Bioquímica se realizó del 19 al 24 de agosto de 1979 en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Chihuahua, en esta ocasión el Comité Organizador y los Editores del II Mensaje Bioquímico, fuimos Y Saldaña, F Fernández y J C Díaz y se contó con la participación de algunos profesores en la organización local encabezada por la Dra. Margarita Escobedo Gameros.

Cuando estábamos en la realización del Taller, coincidió que en esos días el Dr. Guillermo Soberón Rector de nuestra UNAM, tuvo una visita a la Universidad de Chihuahua, en algún espacio nos encontramos y al felicitarnos por nuestro trabajo, mi Maestro me dijo en broma “Yolanda, ahora que termine mi función en Rectoría, le voy a pedir que me organice un Taller para mí solo, pues necesitaré actualizarme” (Fig. 6). Nuestro siguiente Taller el número VII, se realizó del 28 de septiembre al 3 de octubre de 1980 en la Universidad de Yucatán, el Equipo Organizador y Editores del III volumen de Mensaje Bioquímico, fuimos Y Saldaña de Delgadillo, J C Díaz Zagoya y J Guzmán García con la participación muy comprometida de la profesora de la Facultad de Medicina la Dra. Cristina González de MacSwiney. La inauguración la realizó el Rector de la Universidad de Yucatán el Dr. Alberto Rosado G. Cantón y la clausura estuvo a cargo del Dr. Jesús Guzmán, uno de nuestros queridos profesores y que en este Taller era participante de la organización. En esta ocasión tuvimos la presencia de dos invitados del extranjero, ambos de Estados Unidos, el Dr. Fernando Arias de Washington University, en San Luis Missouri, quien nos compartió el tema de “Actividad invasora del trofoblasto y síntesis del activador del plasminógeno” y el Dr. Joseph I Rabinowitz del Veterans Administration Hospital de Philadelphia, quien presentó el tema de “Alcoholismo. Aspectos bioquímicos”.

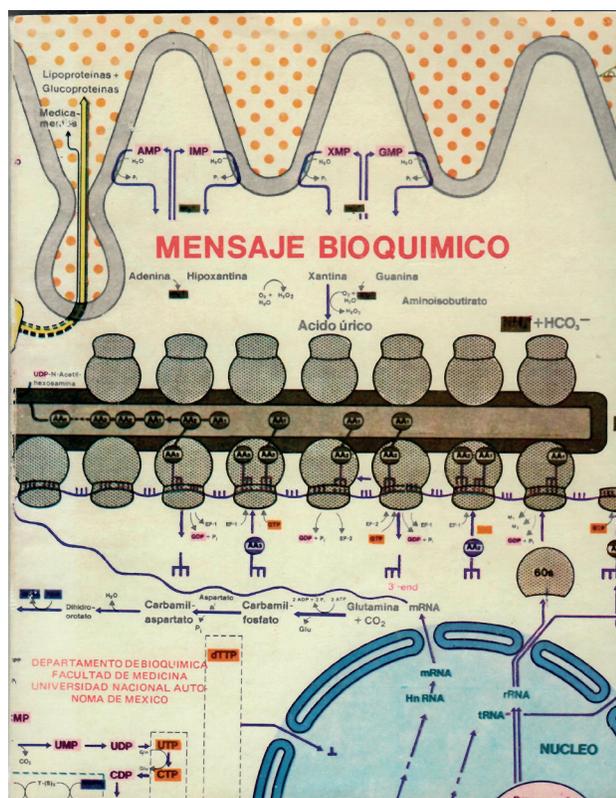


Figura 5. Portada e índice del Volumen I de Mensaje Bioquímico

INDICE	
Prólogo	VII
YOLANDA SALDANA DE DELGADILLO Historia de los Talleres de Actualización Bioquímica	1
CARLOS DEL RIO ESTRADA Las enzimas, magos del cambio químico	11
ANA CECILIA RODRIGUEZ DE ROHO, RANULFO ROMO y PABLO RIVERA HIDALGO Metabolismo de las lipoproteínas hiperlipoproteinemias	23
MARTA ZENTELLA DE PIRA y GABRIEL CARRILLO S Bases moleculares del origen de la vida	71
FRANCISCO JAVIER SANCHEZ GARCIA Experiencia integrativa de Bioquímica con otras materias	119
JESUS RUBEN GARCILASO PEREZ Aspectos bioquímicos de los virus oncogénicos	135
GUILLEMO ALVAREZ LLERA y SARA MORALES LOPEZ La Nutrición una unidad de autoenseñanza	147
LUIS ROGELIO HERNANDEZ MONTENEGRO Excreción de ácido ascórbico en esquizofrénicos	165
ALFREDO DELGADO ARREDONDO Bioquímica y Cibernética	182
JOSE ANTONIO PLIEGO Efecto de la temperatura sobre la velocidad y la energía de activación de las reacciones catalizadas por enzimas membranales	205
J EDGARDO ESCAMILLA MARVAN La esporulación bacteriana	219
ALBERTO HUBERMAN Biosíntesis de proteínas en procaríotes	247

Al mismo tiempo nos aventuramos a invitar al Dr. Severo Ochoa, Premio Nobel en Medicina en 1959, que en esa temporada estaba en Estados Unidos en Roche Institute of Molecular Biology en New Jersey, desafortunadamente declinó la invitación por los compromisos que tenía en esas fechas (Fig. 7).

En 1981 el Taller se iba a realizar en la Ciudad de México y se pensó si lo hacíamos en algún lugar aislado, donde se pudiera continuar con los logros de convivencia que se habían obtenido, especialmente en los últimos años y que a la vez estuviera cerca de la Ciudad de México, podrían asistir un número mayor de profesores de la UNAM; afortunadamente logramos que el apoyo de la Dirección General de Investigación Científica y Superación Académica dependiente de la SEP que había estado dando en tres ocasiones anteriores a las Universidades del interior de la República lo continuara otorgando, lo que nos permitió sufragar los gastos de espacio para las reuniones, viaje y alojamiento para los ponentes durante toda la semana, de este modo el VIII Taller de Actualización Bioquímica se realizó en Oaxtepec, Morelos y se entregó el volumen IV de Mensaje Bioquímico. El Dr. Philip P Cohen de Wisconsin University, en ese entonces estaba en un periodo sabático en nuestro Departamento y presentó el tema "Aspectos de la regulación de la biosíntesis de la urea". Los temas que se trataron en este Taller y que quedaron en el volumen IV del Mensaje Bioquímico se pueden agrupar en dos áreas: ocho temas

fueron de contenido científico y los otros cinco versaron sobre distintas perspectivas de la enseñanza de la bioquímica. El IX TAB se realizó del 3 a 8 de octubre de 1982 en la ciudad de Durango, el Comité Organizador estuvo formado por Y Saldaña Balmori, S Morales López, A Brunner Liebshard, y H Ávila Rodríguez, este último de la Escuela de Medicina de la Universidad Juárez de Durango. Se mandaron las cartas invitación a casi 600 profesores y la asistencia fue de 116 docentes, donde el 61 % eran de universidades del interior del País. Los primeros cuatro volúmenes de Mensaje



Figura 6. Durante la realización del VI Taller de Actualización Bioquímica en Chihuahua, coincidimos con una visita del Dr. Guillermo Soberón, Rector de la UNAM.

Bioquímico, fueron teclados en máquinas de escribir por las secretarías del Departamento de Bioquímica. En 1982, el Dr. Laguna era Director del Centro Universitario de Tecnología Educativa para la Salud (CEUTES) dependiente de la UNAM, platicando con él, le pedimos apoyo para que en esa ocasión el V Mensaje Bioquímico se hiciera en la imprenta del CEUTES, él accedió y la presentación del Mensaje cambió radicalmente; a partir del siguiente año, logramos que ese trabajo lo realizaran en la Imprenta de la Facultad de Medicina hasta que la tecnología cambió, hacia el uso de las computadoras.

En ese año de 1982, me tocó iniciar los trámites para el registro de los volúmenes I al IV de Mensaje Bioquímico ante la Dirección General de Derechos de Autor dependiente de la SEP. El trámite se hizo a mi nombre y quedaron anotados todos los editores participantes: G Álvarez Llera, E Piña Garza, F Fernández Gavarrón, JC Díaz Zagoya, J Guzmán García y A Hamabata Nishimuta (Tabla I).

El X TAB se llevó a cabo del 30 de octubre al 4 de noviembre de 1983 en la Escuela de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, el Comité Organizador estuvo constituido por Y Saldaña Balmori, F Sandoval Zapata, A Hamabata Nishimuta, MC Ramos, JM Rodríguez; los doctores Ramos y Rodríguez eran profesores de la Universidad sede y el resto

del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. Como era ya una costumbre, se entregó antes de que iniciaran las reuniones, el volumen VI de Mensaje Bioquímico conteniendo el texto de todas las ponencias que se presentarían. A este Taller asistieron 88 profesores donde el 36% eran de la Universidad Potosina, 40% de la Ciudad de México y el resto de las diferentes universidades del País, además tuvimos la asistencia de una profesora de Guatemala. Posterior al TAB se llevó a cabo el curso teórico-práctico sobre “Receptores de membranas” impartido por los doctores Jaime Flores del CINVESTAV, IPN y Jesús Manuel Rodríguez de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí que se realizó del 7 al 11 de mismo mes de noviembre, a este curso asistieron 9 participantes que habían sido inscritos con anterioridad y que contaron con becas otorgadas por la SEP. Es importante mencionar que en algunas ocasiones hubo dificultades para la realización del Taller, en 1984 el Comité Organizador del XI TAB estuvo constituido por Y Saldaña de Delgadillo, G Álvarez Llera, M Zentella de Piña y el Dr. Carlos Alcocer Cuarón este último de la Universidad Autónoma de Querétaro y se realizó del 17 al 22 de septiembre de 1984 en Ciudad Universitaria, UNAM. La reunión iba a ser en Querétaro, pero una huelga académica en la Universidad lo impidió, de esto nos enteramos a dos días del inicio del TAB y la manera en que lo resolvimos fue cambiando bruscamente la sede gracias al apoyo del Director del entonces Centro de Investigaciones en Fisiología Celular UNAM (ahora Instituto de Fisiología Celular UNAM), el Dr. Antonio Peña Díaz, que nos prestó el Auditorio, pero en lugar de iniciar con las inscripciones y entrega de material, el domingo 16 en la tarde como era costumbre de los últimos años, se desplazó 24 horas, para dar oportunidad de que aquellos profesores que llegaran a Querétaro se pudieran mover a la Ciudad de México, afortunadamente pudimos avisar por teléfono a algunos profesores que teníamos la certeza de que asistirían, además, los organizadores encabezados por el Dr. Alcocer en Querétaro, pusieron letreros en algunos hoteles, en la terminal de autobuses y en el aeropuerto avisando del cambio; con esto quedó demostrado que cuando se tiene el convencimiento de algo, se hace lo imposible para lograrlo. De igual manera que en los años anteriores, junto con las inscripciones se entregó el volumen VII de Mensaje Bioquímico con el texto de las ponencias del Taller.

Otro ejemplo crítico fue al año siguiente, en 1985 los sismos que sacudieron a la Ciudad de México fueron los días 19 y 20 de septiembre y el Taller estaba convocado para los días 22 al 27 de ese mes en Zacatecas, debido a los sismos, la comunicación se interrumpió entre los organizadores locales y los del Departamento de Bioquímica, no había servicio telefónico en la Ciudad de México y por lo tanto, los profesores que habrían de asistir de distintos sitios del País, llamaban a Zacatecas preguntando si la actividad se interrumpía y lo que les contestaban era “Si vienen los de México, sí habrá Taller”. Nosotros hicimos lo indecible, a pocas horas del temblor yo fui a la línea aérea a recoger

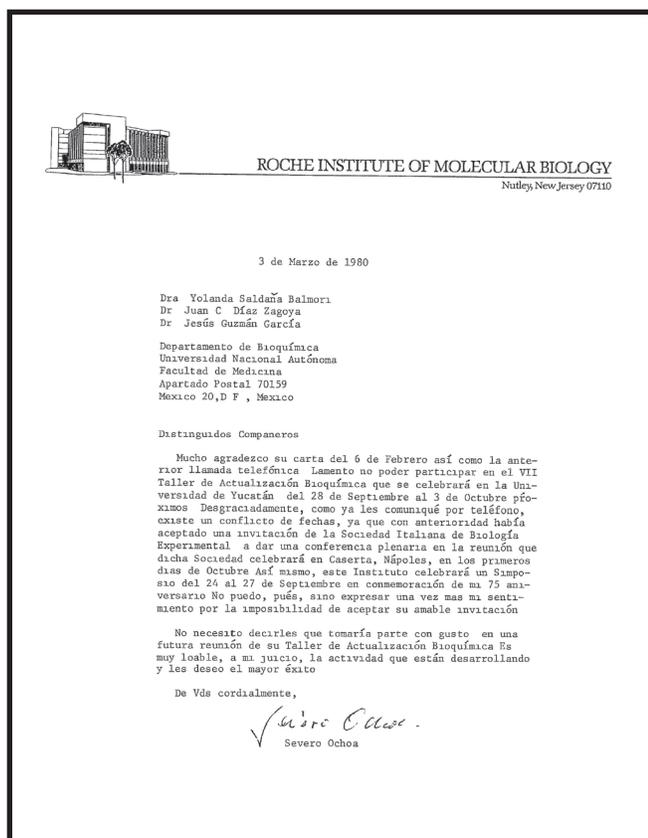


Figura 7. Carta del Dr. Severo Ochoa, indicando la razón por la que declina a nuestra invitación de participar en el TAB de 1980.

Tabla I. Registro de los primeros volúmenes de Mensajes Bioquímicos ante la Dirección General de Derechos de Autor, Secretaría de Educación Pública.

FECHA	VOLUMEN	CONTROL	No. DE REGISTRO	LIBRO	FOJAS
3 mayo 1982	I	02651	589	9	340
3 mayo 1982	II	02651	590	9	340
3 mayo 1982	III	02651	591	9	340
28 mayo 1982	IV	09374	698	11	371

los boletos de avión de 15 profesores, ahí el desconcierto era total y pasaron varias horas para conseguir mi objetivo. Algunos de los profesores jóvenes del Departamento fueron un apoyo significativo, pues como no había teléfono para comunicarnos con los profesores, ellos nos ayudaron yendo a las casas de los ponentes del Taller a entregarles sus boletos de avión para salir el domingo 22 en la mañana. El Comité Organizador central estuvo integrado por los profesores de la UNAM G Álvarez Llera, Y Saldaña de Delgadillo, S Jiménez Thomas, A Hernández Tobías, y E Escamilla Marván y por los profesores M Escobar Luján y R Bañuelos Valenzuela de la Universidad Autónoma de Zacatecas. El tiraje del volumen VIII del Mensaje Bioquímico fue de 1,000 ejemplares al igual que se venía haciendo desde el primer volumen. De esta manera el XII Taller de Actualización Bioquímica se realizó en Zacatecas sin complicaciones, para la sorpresa de algunos. Un grupo de profesores de Bioquímica de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” solicitaron de una manera entusiasta y decididamente apoyados por sus autoridades, que el Taller correspondiente al año de 1986 se pudiera realizar en sus instalaciones, fue así que del lunes 15 al viernes 19 de septiembre de ese año se llevó a cabo el XIII Taller de Actualización Bioquímica en Saltillo Coahuila, al mismo tiempo se entregó al inicio de la reunión el volumen IX de Mensaje Bioquímico. El Comité Organizador y editor del Mensaje, estuvo formado por S Jiménez Thomas, Y Saldaña

de Delgadillo y A Cárabez Trejo, el trabajo realizado por las organizadoras locales, las profesoras Margarita Murillo, Luz Elena Pérez y Rosalinda Mendoza, fue determinante para el éxito de la reunión. Para la realización de este Taller se contó con el apoyo del CONACyT, de la Facultad de Medicina de la UNAM y de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” del Estado de Coahuila.

En 1987 el Comité Organizador del XIV Taller de Actualización Bioquímica y editores del X Mensaje Bioquímico estuvo conformado por L Fernández Rivera-Río, Y Saldaña de Delgadillo, S Jiménez Thomas y S Morales López, el Taller se celebró del 5 al 9 de octubre en las instalaciones de la Unidad de Seminarios Ignacio Chávez en Ciudad Universitaria. Como parte del programa el primer día de trabajo se presentaron los siguientes temas: “Etapas para el desarrollo de guiones educativos”, “La elaboración de unidades de auto-enseñanza” y “Unidad audio-visual, fotosíntesis, fase luminosa” las cuales sirvieron de apoyo para que los asistentes al Taller en pequeños grupos, durante dos horas los días martes, miércoles y jueves elaboraran trabajos relacionados con el enfoque presentado y el viernes cada uno de esos grupos, puso en común lo producido. En el Mensaje Bioquímico de este año quedó incluido el capítulo “Metabolismo del etanol” elaborado por los Dres. Martha Zentella de Piña y Enrique Piña Garza, el cual no formó parte de la programación del Taller (Tabla II).

Tabla II. Primeros Talleres de Actualización Bioquímica.

TAB	AÑO	Asistentes	NACIONALES del interior del País	NACIONALES de Ciudad de México	EXTRANJEROS	Universidades representadas	SITIO DE REALIZACIÓN
I	1974	64	22	40	2	13	UNAM
II	1975	82	29	50	3	10	UNAM
III	1976	121	40	0	1	14	UNAM
IV	1977	147	50	96	1	16	UNAM
V	1978	72	43	29	0	13	Universidad de Coahuila
VI	1979	90	39	51	0	14	Universidad de Chihuahua
VII	1980	114	60	50	4	14	Universidad de Yucatán
VIII	1981	97	37	59	1	17	Oaxtepec
IX	1982	116	70	46	0	16	Universidad de Durango
X	1983	88	52	35	1	10	Universidad de San Luis Potosí
XI	1984	75	32	43	0	12	UNAM
XII	1985	92	75	17	0	19	Universidad de Zacatecas
XIII	1986	77	42	35	0	15	Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
XIV	1987	86	29	55	2	13	UNAM

Los datos de los Talleres I a VIII fueron tomados de referencia (6), los del Taller IX fueron tomados de la referencia (7). La Tabla reúne los datos de los Talleres en los que yo he participado en la organización, de los años 1974 a 1987 (a excepción del de 1976).

Durante los años 1988 a 1991, el entonces Jefe del Departamento de Bioquímica Dr. Juan C Díaz Zagoya, encargó a diferentes profesores que se hicieran cargo de la organización, realización del Taller de Actualización Bioquímica y de la edición del Mensaje Bioquímico de los años correspondientes; gracias al enfoque que ellos tuvieron en mente, en septiembre de 1988 se realizó en el Palacio de la Escuela de Medicina UNAM, el I Taller Latinoamericano de Educación Bioquímica y el XV Taller de Actualización Bioquímica, donde se entregó el XI Mensaje Bioquímico.

De una manera semejante al año siguiente, el II Taller Latinoamericano de Educación Bioquímica y XVI Taller de Actualización Bioquímica se realizó en la Universidad Autónoma de Puebla, del 11 al 15 de septiembre de 1989, del mismo modo que en los años anteriores se editó y entregó entonces, el volumen XII de Mensaje Bioquímico.

Dentro de los cambios realizados en esta temporada, en el año de 1990 se editaron los volúmenes XIII y XIV de Mensaje Bioquímico, los editores del primero fueron: S López Quintero, ME Salinas y Mejía, MA Vázquez Alcántara, F Fernández Gavarrón y JC Díaz Zagoya, y los del segundo, fueron: G Carrillo Santín, S López Quintero, ME Salinas y Mejía, G Maldonado Mercado y JC Díaz Zagoya.

En 1992 el entonces Jefe del Departamento de Bioquímica Dr. Jaime Mas Oliva, me pidió que me ocupara de la organización del XIX Taller, una actividad a la que yo apreciaba entrañablemente por todo mi historial en ella de lo que ya he dado cuenta en este documento; para llevarlo a cabo invité a los Dres. Jesús Manuel León Cazares, Alberto Huberman y Alberto Hamabata, a que juntos formáramos el Comité Organizador y la edición del volumen XVI del Mensaje Bioquímico. El Taller se realizó en el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina UNAM, la inscripción se hizo el domingo 4 de octubre por la tarde y las sesiones fueron los días 5, 6 y 7. La razón de esta reducción a sólo tres días de trabajo fue debido a que, en los años inmediatos anteriores, el Taller se organizó junto con el Congreso de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, AC. para constituir la Semana de Educación Bioquímica, conservando cada una de las dos actividades su perfil propio.

Al año siguiente, en el Palacio de la Escuela de Medicina UNAM se realizó la II Semana de Educación Bioquímica, el XX TAB llevó a cabo sus actividades del 5 al 8 de septiembre de 1993, en los días siguientes la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica AC. tuvo su Congreso. La Comisión Organizadora del TAB y editoras del volumen XVII de Mensaje Bioquímico fuimos Y Saldaña de Delgadillo, S Morales López y P del Arenal Mena. Se contó con una asistencia de 93 profesores de los cuales 33 provenían de 17 universidades del interior del país: Chihuahua, Chiapas, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas. La inauguración la hizo el Director de la Facultad

Dr. Juan Ramón de la Fuente y la clausura la realizó el Jefe de Departamento, el Dr. Jaime Mas Oliva.

En los años 1988-1991 y en los posteriores (a excepción de los años 1992-1993), mi participación en los Talleres fue la de asistente, por lo tanto, es muy poca la información que tengo acerca de la organización del TAB y de la edición del Mensaje Bioquímico, pero lo que sí sé, es que todos los profesores que han participado, lo han hecho con entusiasmo y entrega a este servicio que el Departamento de Bioquímica ofrece a los académicos y estudiantes relacionados con nuestra disciplina. Debo señalar que en 1990 se obtuvo el ISSN (por sus siglas en inglés de "International Standard Serial Number") para el Mensaje Bioquímico con el número: 0188-137X; independientemente de que el trámite para la obtención de los certificados de título y contenido, se ha realizado con regularidad.

En la Tabla III, están anotados los datos de los 50 Talleres de Actualización Bioquímica, los nombres de los 63 profesores que a través de ese tiempo participamos en la organización de los cuales 59, hemos sido editores del Mensaje Bioquímico. Modificada de referencia (4).

El Taller de Actualización Bioquímica durante todo el tiempo que ha pasado desde su inicio, ha tenido características que han persistido, la más determinante es su presencia ininterrumpida durante los 50 años y la edición de 47 volúmenes de Mensaje Bioquímico; otras se han modificado, ya sea por las necesidades o por los cambios que inminentemente se han dado a través del tiempo transcurrido, por el enriquecimiento en tecnologías, entre ellas está: la reducción de cinco a tres días de sesiones que en un principio se dio por su asociación con el Congreso de Profesores de Bioquímica y luego por el cambio de enfoque hacia la presentación de conferencias; en alguna época, los tiempos dedicados a cada sesión tenía más duración; en ocasiones, ha habido más interacción entre los ponentes y los asistentes; en el tiempo de la pandemia de COVID-19 la comunicación se realizó en línea; etc. pero algo que no ha cambiado, es la entrega de los profesores participantes en la organización del Taller y edición del Mensaje, la respuesta de profesores y estudiantes, además, algo muy importante es el convencimiento que las autoridades del Departamento de Bioquímica y de la Facultad de Medicina han tenido para que el Taller que inició como un evento que iba a ocurrir sólo en 1974, haya continuado hasta nuestros días.

Estoy segura que todos los que, en su momento, hemos trabajado para el Taller de Actualización Bioquímica, nos hemos sentido satisfechos de la aportación realizada para la construcción de esta obra que está inmersa en el compromiso que tiene la Universidad Nacional Autónoma de México ya que como su nombre lo indica es una Institución NACIONAL.

Tabla III. 50 años de Taller de Actualización Bioquímica y 47 de Mensaje Bioquímico

AÑO	NÚM. DE TAB	NÚM. DE MENSAJE BIOQUÍMICO	ORGANIZADORES Y EDITORES
	I		E Piña Garza, R Tapia Iburguioitia, Y Saldaña Balmori, M Carrillo Santín y G Álvarez Llera.
1975	II		J Soria Díaz Infante, Y Saldaña de Delgadillo, F Fernández Gavarrón, M Carrillo Santín y G Álvarez Llera.
1976	III		JC Díaz Zagoya y O Robinson.
1977	IV		E Piña Garza, Y Saldaña Balmori, G Álvarez Llera, M Carrillo Santín y F Fernández Gavarrón.
1978	V	I	Y Saldaña de Delgadillo, G Álvarez Llera y E Piña Garza.
1979	VI	II	Y Saldaña de Delgadillo, F Fernández Gavarrón y JC Díaz Zagoya.
1980	VII	III	Y Saldaña de Delgadillo, JC Díaz Zagoya y J Guzmán García.
1981	VIII	IV	Y Saldaña de Delgadillo, A Hamabata Nishimuta y J Guzmán García.
1982	IX	V	Y Saldaña de Delgadillo, S Morales López y A Brunner Liebshard.
1983	X	VI	Y Saldaña de Delgadillo, F Sandoval Zapata y A Hamabata Nishimuta.
1984	XI	VII	Y Saldaña de Delgadillo, G Álvarez Llera y M Zentella de Piña.
1985	XII	VIII	G Álvarez Llera, Y Saldaña de Delgadillo, S Jiménez Thomas, A Hernández Tobías y E Escamilla Marván.
1986	XIII	IX	S Jiménez Thomas, Y Saldaña de Delgadillo y A Cárabez Trejo.
1987	XIV	X	L Fernández Rivera-Rio, Y Saldaña de Delgadillo, S Jiménez Thomas y S Morales López.
1988	XV	XI	MA Vázquez Alcántara, J Ponce Frausto y ME Salinas y Mejía.
1989	XVI	XII	ME Salinas y Mejía, MA Vázquez Alcántara, J Ponce Frausto, F Fernández Gavarrón y JC Díaz Zagoya.
1990	XVII	XIII	S López Quintero, ME Salinas y Mejía, MA Vázquez Alcántara, F Fernández Gavarrón y JC Díaz Zagoya.
		XIV	G Carrillo Santín, SE López Quintero, ME Salinas y Mejía, G Maldonado Mercado y JC Díaz Zagoya.
1991	XVIII	XV	G Carrillo Santín, JC Díaz Zagoya, S López Quintero, F Martínez Montes y ME Salinas y Mejía.
1992	XIX	XVI	Y Saldaña de Delgadillo, JM León Cazares, A Huberman y A Hamabata Nishimuta.
1993	XX	XVII	Y Saldaña de Delgadillo, S Morales López y P del Arenal Mena.
1994	XXI	XVIII	S Morales López, F Martínez Montes y A Saavedra Molina.
1995	XXII	XIX	F Martínez Montes, S Morales López, ME Jiménez Cataño y V Saavedra Alanís.
1996	XXIII	XX	MA Juárez Oropeza, S Morales López y F Martínez Montes.
1997	XXIV	XXI	J P Pardo Vázquez, MA Juárez Oropeza, S Morales López, F Martínez Montes.
1998	XXV	XXII	J P Pardo Vázquez, MA Juárez Oropeza, S Morales López, F Martínez Montes.
1999	XXVI	XXIII	F Martínez Montes, MA Juárez Oropeza, JP Pardo Vázquez y S Morales López.
2000	XXVII	XXIV	F Martínez Montes, MA Juárez Oropeza, S Morales López y JP Pardo Vázquez.
2001	XXVIII	XXV	MA Juárez Oropeza, JP Pardo Vázquez, IP del Arenal Mena, A Cea Bonilla y E Piña Garza
2002	XXIX	XXVI	A Cea Bonilla, IP del Arenal Mena, H Riveros Rosas y E Vázquez Contreras
2003	XXX	XXVII	O Flores Herrera, H Riveros Rosas, A Sosa Peinado y E Vázquez Contreras
2004	XXXI	XXVIII	O Flores Herrera, H Riveros Rosas, A Sosa Peinado y E Vázquez Contreras
2005	XXXII	XXIX	O Flores Herrera, H Riveros Rosas, A Sosa Peinado y E Vázquez Contreras
2006	XXXIII	XXX	O Flores Herrera, I Velázquez López E Rendón Huerta y J Oria Hernández,
2007	XXXIV	XXXI	J Oria Hernández, E Rendón Huerta, H Reyes Vivas, I Romero Álvarez e I Velázquez López
2008	XXXV	XXXII	I Bustos Jaimes, C Castañeda Patlán, J Oria Hernández, E Rendón Huerta, H Reyes Vivas e I Romero Álvarez
2009	XXXVI	XXXIII	I Bustos Jaimes, C Castañeda Patlán, E Rendón Huerta, H Reyes Vivas e I Romero Álvarez
2010	XXXVII	XXXIV	G Álvarez Fernández, I Bustos Jaimes, C Castañeda Patlán, J Guevara Fonseca, I Romero Álvarez y H Vázquez Meza
2011	XXXVIII	XXXV	G Álvarez Fernández, I Bustos Jaimes, C Castañeda Patlán, J Guevara Fonseca y H Vázquez Meza
2012	XXXIX	XXXVI	J Guevara Fonseca, D Matuz Mares y H Vázquez Meza
2013	XL	XXXVII	A Butanda Ochoa, E Rendón Huerta, J Guevara Fonseca, A Guevara Flores, D Matuz Mares y H Vázquez Meza
2014	XII	XXXVIII	A Butanda Ochoa, A Guevara Flores, D Matuz Mares, R Lara Lemus y PV Torres Durán

2015	XIII	XXXIX	A Butanda Ochoa, M González Andrade, A Guevara Flores, R Lara Lemus, D Matuz Mares, E Molina y PV Torres Durán
2016	XIIII	XL	A Guevara Flores, M González Andrade, R Lara Lemus, J de J Martínez González y PV Torres Durán
2017	XIVL	XLI	C Cárdenas Monroy, J de J Martínez González, M González Andrade, LH Ramírez Silva y G Hernández Alcántara
2018	XLV	XLII	C Cárdenas Monroy, M González Andrade, G Hernández Alcántara, J de J Martínez González y LH Ramírez Silva.
2019	XLVI	XLIII	C Cárdenas Monroy, M González Andrade, G Hernández Alcántara, J de J Martínez González y LH Ramírez Silva.
2020	XLVII	XLIV	M González Andrade, G Hernández Alcántara, J de J Martínez González, LH Ramírez Silva y M Vilchis Landeros.
2021	XLVIII	XLV	M González Andrade, G Hernández Alcántara, J de J Martínez González, LH Ramírez Silva y M Vilchis Landeros.
2022	XLIX	XLVI	M González Andrade, G Hernández Alcántara, J de J Martínez González, N Meraz Cruz, LH Ramírez Silva y M Vilchis Landeros.
2023	L	XLVII	G Hernández Alcántara, N Meraz Cruz, LH Ramírez Silva y M Vilchis Landeros.

Modificada de referencia (6)

Referencias

1. Avendaño-Inestrillas J. (2004). La saga de la Facultad de Medicina (1971-1991) en Humberto Gasca González CRÓNICA de la Facultad de Medicina, Tomo II. 1971-1991. Facultad de Medicina, UNAM.
2. Pérez-Rivera G. (1987) La formación docente en la perspectiva del Centro de Didáctica y su proyección en el Centro de Investigaciones y Servicios Educativos (CISE) de la UNAM. *Perfiles Educativos*. 38, 5-19
3. Sánchez-Mendiola M, Martínez-Hernández AM del P. (2019) Formación docente en la UNAM. *Coordinación de Desarrollo Educativo e Innovación Curricular*, UNAM.
4. Saldaña Balmori Y. (2018) Historia del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Volumen XLII de Mensaje Bioquímico. Facultad de Medicina UNAM, 42,147-166
5. Saldaña Y, Álvarez G y Piña E. (Eds.) (1978) Volumen I de Mensaje Bioquímico. Facultad de Medicina, UNAM.
6. Saldaña de D Y. (1982) El rincón del Taller. BEB 82, I (2), 27-28
7. Saldaña de D Y. (1982) Informe sobre el IX Taller de Actualización Bioquímica. BEB 82, I (4), 23-25



DRA. YOLANDA SALDAÑA BALMORI

ORCID: 0000-0002-7433-3225

Nació en Tula Tamaulipas el 5 de marzo de 1938, estudió la carrera de Químico Farmacobiólogo en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y el Doctorado en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Profesor de tiempo completo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM por 55 años.

Su trabajo académico es relacionado con los tres giros de la UNAM: Docencia, Investigación y Difusión de la Cultura, en docencia impartió 89 cursos de Bioquímica en la Facultad de Medicina (Bioquímica, Bioquímica e Inmunología o Bioquímica y Biología Molecular), donde aproximadamente 4,500 estudiantes fueron sus alumnos, además, ha sido profesora de posgrado en las Facultades de Medicina, Química y Odontología de la UNAM. Su trabajo en investigación se ha desarrollado tanto en la investigación básica como en la educativa. En el primer caso participó en el estudio del metabolismo del colesterol y purificación de la cicloaldolasa (1964-1969) y más tarde, en proyectos relacionados con la acción de algunos antiinflamatorios no esteroideos, ante la generación de radicales libres ocasionados por intoxicación alcohólica (1988-1994). En investigación educativa, ha sido líder del proyecto relacionado con la evaluación del aprendizaje de la Bioquímica en la Facultad de Medicina, basándose en los resultados obtenidos por los estudiantes en las evaluaciones institucionales. En el campo de la difusión de la cultura, ha sido la principal organizadora de los primeros Talleres de Actualización Bioquímica, editora de los primeros 12 volúmenes de Mensaje Bioquímico, Coordinadora Editorial de los primeros 11 años de Boletín de Educación Bioquímica y posteriormente, editora desde su fundación hasta la fecha, del mismo Boletín, que cambió su nombre a Revista de Educación Bioquímica.

Cuenta con la publicación de 18 artículos en revistas internacionales con comité editorial; 87 artículos en revistas científicas nacionales; 32 de difusión científica; conferencias en diferentes foros; ha presentado su trabajo en 55 congresos internacionales y en 87 nacionales. Tiene publicados 89 diferentes crucigramas científicos, publicados trimestralmente como CRUCIBIOQ de la Revista de Educación Bioquímica, de los cuales se tienen registradas poco más de 40,000 visitas en línea. Ha recibido múltiples reconocimientos, entre otros, la UNAM en 2012, le otorgó el Sor Juana Inés de la Cruz; el Gobierno del Estado de Tamaulipas le entregó, en 2005 el Diploma y la Medalla al Mérito Luis García de Arellano, otorgado al mejor tamaulipeco del año; en Tula, Tamaulipas en 2005, se instituyó la Medalla Yolanda Saldaña Balmori que se entrega anualmente, a profesores de cualquier nivel que ese año cumpla 40 años de servicio; además, ha recibido varios reconocimientos otorgados por instituciones del País y del extranjero.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 21-35

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Estudio inmunoproteómico de las alergias alimentarias.

Immunoproteomics study of food allergies.

Reyes Vivas, Horacio^{1*}, Torres Arroyo Angélica¹, Mendoza Hernández David Alejandro², Juan Martínez Aguilar³, Alberto Enrique Fernández Molina¹, Aramiz López Durán⁴, López-Pérez Gerardo T.², Bautista García Sandra Guadalupe², Oria Hernández Jesús Antonio¹.

¹Laboratorio de Bioquímica-Genética, Instituto Nacional de Pediatría.

²Servicio de Alergia, Instituto Nacional de Pediatría.

³Red de Apoyo a la Investigación, Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán,

⁴Servicio de Ortopedia, Instituto Nacional de Pediatría.

*Correspondencia. Laboratorio de Bioquímica-Genética, Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Sur 3700 Letra C, Av. Insurgentes Sur, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, CDMX (México), C.P. 04520 Tel. +52 (55) 1084-0900 ext. 1442, hreyesvivas@yahoo.com.mx

Resumen

Las alergias son enfermedades crónicas que comprometen seriamente la calidad de vida del paciente llegando a ser fatales cuando se presenta anafilaxia y no se atiende a tiempo. La Organización Mundial de la Salud estima que su prevalencia mundial es de entre 1 al 8%, incrementándose en los últimos años y se consideran, junto con la obesidad, como las dos principales pandemias no infecciosas que afectan al ser humano. Se han reportado cientos de alérgenos en diversas bases de datos, donde la constitución de éstos es principalmente de naturaleza proteica. La mayoría de las bases de datos se basan en información proveniente de América del Norte (Canadá y EUA), Europa y Asia, mientras que la contribución de alérgenos identificados en Latinoamérica es escasa. Debido a que las alergias presentan un componente geográfico importante, es sustancial conocer los principales alérgenos que afectan a la población mexicana, así como

Abstract

Allergies are chronic diseases that seriously compromise the quality of life of the patient becoming fatal when anaphylaxis is reached and is not immediately attended to. The World Health Organization estimates that allergies prevalence ranged from 1-8% increasing in the last years, together with obesity, they have been considered as the main non-infectious pandemics. Hundreds of allergens are currently reported in which their constitution is mainly proteic. Most allergen databases are built from studies of North America (Canada and EUA), Europe, and Asia, whereas the contribution of identified allergens in Latin America is scarce. Since allergies show a geographic component, the knowledge of principal allergens affecting the Mexican population and novel allergenic components discovers are of utmost relevance. The consequences of obtaining such information are, besides generating novel scientific evidence,

identificar posibles nuevos componentes alergénicos no descritos. La relevancia de obtener esta información es, aparte de generar nuevo conocimiento científico, impactar en el diagnóstico de certeza en las alergias y sentar las bases para tratamientos por inmunoterapia con los alérgenos que afectan con más frecuencia en nuestra población incrementando así la eficiencia de la intervención terapéutica. Este trabajo se centrará en dos ejemplos de alergias alimentarias en población pediátrica, la alergia a la manzana y la alergia a la leche de vaca. Los resultados muestran que utilizando enfoques inmunoproteómicos, logramos obtener los alérgenos más frecuentes en estos alimentos que afectaron a un grupo de pacientes pediátricos alérgicos. Además, se obtuvo evidencia de nuevos posibles alérgenos cuya confirmación se encuentra en proceso.

Palabras clave: Inmunoproteómica, alergia, IgE, IgG₁, espectrometría de masas.

to impact the accurate diagnosis of allergies and lay the groundwork for immunotherapy treatments by using the most frequent allergens affecting our population increasing the success of therapeutic interventions. This work is focused on two examples of food allergies in the pediatric population, apple allergy, and cow's milk allergy. The data show that through immunoproteomic approaches, we obtained the most frequent allergens affecting an allergic pediatric group. Furthermore, evidence of novel allergens was performed, and their confirmation is currently in progress.

Keywords: Immunoproteomics, allergy, IgE, IgG₁, mass spectrometry.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud ha establecido que actualmente las dos pandemias no infecciosas son la obesidad y las alergias, éstas últimas afectando a cerca de 150 millones de personas (1). Las alergias reducen significativamente la calidad de vida del paciente, promoviendo una condición crónica patológica por una atención inadecuada y tardía de la enfermedad llegando incluso al fallecimiento del paciente cuando se presenta anafilaxia. La alergia se define como *manifestaciones clínicas desencadenadas por el contacto con una fuente alérgica, capaz de promover respuesta inflamatoria alérgica* (2). Las manifestaciones clínicas por las alergias son muy diversas y se pueden clasificar en respiratorias, cutáneas, gastrointestinales, entre otras. Estas manifestaciones involucran al sistema inmunológico y pueden incluir mecanismos mediados por anticuerpos, por células o por ambos. Se ha establecido que las alergias pueden clasificarse en tres categorías (3): alergias mediadas por las inmunoglobulinas tipo E (IgE), alergias no mediadas por IgE y alergias mixtas donde están involucrados mecanismos mediados por IgE y por células.

Nomenclatura y bases de datos de alérgenos

Los componentes moleculares que más frecuentemente producen alergias son las proteínas, sin embargo, también debe considerarse que algunos carbohidratos están involucrados en el fenómeno de alergias (4). Para nombrarlos, existe una nomenclatura oficial generando una abreviatura a partir de la fuente biológica de donde proviene el alérgeno (4–6). La abreviatura utiliza las tres o cuatro primeras letras del género, seguida de una o dos letras de la especie continuando con un número arábigo que refiere al orden en que se descubrió. En la abreviatura, se puede añadir el prefijo “n” cuando se trata de componentes naturales, o bien “r” cuando se obtuvo mediante tecnología recombinante. Por ejemplo, la leche de vaca (*Bos taurus*) contiene el alérgeno beta-caseína nombrado como Bos d 11; el abedul (*Betula verrucosa*) contiene una proteína alérgica llamada PR-10 que se nombra Bet v 1. Además, la nomenclatura considera los denominados isoalérgenos; se definen como múltiples formas moleculares del mismo alérgeno de una misma especie y presentan un 67% o más de identidad en su secuencia aminoácil. La nomenclatura de los isoalérgenos incluye adicionar dos o más dígitos después del primer número arábigo y un punto decimal. Por ejemplo, para Bet v 1, existen los isoalérgenos Bet v 1.01, Bet v 1.13, etc. Adicionalmente, existen isoformas o variantes de alérgenos, estos se definen como aquellas formas del mismo alérgeno mostrando un intervalo de identidad de 73% a

98%. Las isoformas se señalan añadiendo dos o más dígitos después de los números que describen a los isoalergenos; por ejemplo, Bet v 1.0102, Bet v 1.0116.

Existen diferentes bases de datos donde se clasifican los alérgenos (**Cuadro I**).

Cada uno tiene diferentes criterios de clasificación. Por

ejemplo, *AllFam* clasifica los alérgenos por familias, la página de la Organización mundial de la salud, junto con la Unión Internacional de Sociedades en Inmunología (*WHO/IUIS*, por sus siglas en inglés) clasifica a los alérgenos por su nomenclatura sistemática. Las principales regiones que contribuyen a estas bases de datos son América del Norte

Cuadro I. Bases de datos que contienen alérgenos descritos

NOMBRE DE BASE DE DATOS	PÁGINA DE INTERNET
Allergen Online	http://www.allergenonline.org/
WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee	http://www.allergen.org/
Allergome	https://www.allergome.org/
The COMPARE Allergen Database	https://comparedatabase.org/
AllerBase	http://bioinfo.unipune.ac.in/AllerBase/Home.html
Allfam	http://www.meduniwien.ac.at/allfam/

(Canadá y EU), Europa y Asia. Estas regiones también contribuyen de forma muy significativa en el conocimiento a nivel molecular de las alergias. En la región Latinoamericana, específicamente hablando de México, la aportación al conocimiento de los alérgenos a nivel molecular es todavía limitada, donde los grupos de la Dra. Adela Rodríguez Romero del Instituto de Química de la UNAM, y del Dr. Luis Manuel Terán del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, pueden tomarse como pioneros. Claramente, en México se requiere un mayor número de estudios a nivel molecular de las alergias y las moléculas que promueven estas enfermedades. Esta información repercutirá en realizar diagnósticos más precisos a los pacientes, así como mejorar los tratamientos con inmunoterapias más efectivas.

Epidemiología

Se estima que la prevalencia de alergias en el mundo es del 25% con una tendencia a incrementarse en países desarrollados (1,7). En relación con las alergias alimentarias, la organización mundial de la salud (OMS) y el Instituto de Medicina determinaron que su intervalo de prevalencia es desde un 1.1% hasta el 10.8% dependiendo del país y la edad del paciente (8). Existe una gran variedad de alimentos considerados como alérgenos, sin embargo, a nivel mundial existe un conglomerado denominado como

“los ocho principales grupos de alérgenos alimentarios”.

En este grupo se incluyen los siguientes alimentos: huevo, cacahuete, nuez, pescados y mariscos, trigo, soya, ajonjolí y la leche de vaca. Sus frecuencias de alergenicidad varían dependiendo de la región geográfica, lo cual demuestra diferencias en sensibilidad de cada población, posiblemente debido a diferencias en sus contextos sociales, genéticos y de otra naturaleza (7,9,10). Por ejemplo, para Europa, la prevalencia de alergia al huevo es de 1.7% mientras que, para las regiones de Asia, el Este Medio y África, la prevalencia se incrementa entre 3.0% y 3.3 (11). Para el caso del cacahuete, en estas mismas regiones, la prevalencia es de entre 2% al 11% mientras que, para Canadá, el valor disminuye a 1% (12).

En México, no se tienen suficientes datos epidemiológicos para determinar prevalencias, sin embargo, existe información que permite definir algunas frecuencias. Por ejemplo, a diferencia de otras regiones como Europa, Asia o América del Norte (EUA y Canadá), en México se sabe que uno de los principales alimentos alérgenos es la manzana (*Malus domestica*) y otras frutas pertenecientes a la familia Rosaceae (pera y durazno) (13). Además, dentro de los ocho principales alérgenos alimentarios se encuentran la nuez, pescado y mariscos, cacahuete, huevo, leche y trigo. A nivel pediátrico, donde un gran número de individuos inician las alergias, se ha observado que la leche de vaca junto con las

frutas de la familia Rosaceae y el plátano (*Musa paradisiaca*), son los principales alimentos alergenos (14–16).

Estos datos muestran la regionalización de los alergenos en distintas zonas geográficas y etnias. Por lo anterior, es fundamental determinar las prevalencias de los alergenos en nuestro país. Adicionalmente, como ya se señaló, es esencial definir si los componentes moleculares alergénicos reportados en las bases de datos internacionales son representativos en nuestra población mexicana, o bien, existen en nuestro país componentes importantes sin identificar que deben considerarse para el diagnóstico y posible tratamiento de la alergia.

En ese contexto, consideramos que el enfoque de la proteómica, específicamente la inmunoproteómica, en combinación con la biología molecular recombinante, pueden aportar información relevante al respecto. En este trabajo se mostrarán algunos ejemplos de su utilización, sus posibles interpretaciones, así como los alcances y limitaciones de estas herramientas moleculares en el diagnóstico y tratamiento de las alergias alimentarias.

Antecedentes

La **proteómica** se define como *el estudio de cambios de expresión, así como de modificaciones postraduccionales (MPT) durante una condición metabólica, normal o patológica, de un cultivo celular, microorganismos, tejido u órgano* (17). El objetivo es conocer cuáles proteínas cambiaron de expresión o de MPT. Estos cambios pueden compararse, por ejemplo, entre condiciones fisiológicas y una condición donde se estimule o modifique al sistema biológico a estudiar, como la adición de una hormona, citocinas, nutrientes, etc. El cambio de expresión también puede compararse contra una condición patológica, como la adición de toxinas, inhibidores, o inclusive fármacos o compuestos con potencial farmacológico.

Otra segunda área que la proteómica puede estudiar es la interacción entre proteínas denominada como **interatoma**, donde un grupo de proteínas conocidas o identificables pueden operar como “anzuelos”, las cuales interactuarán con otras no conocidas que fungirán como “presas”. El objetivo será identificar cuáles proteínas son las presas. En ese contexto, la **inmunoproteómica** se relaciona con esta característica, donde el extracto proteico de algún

alergeno (“presa”, planta, hongo, insecto, alimento, etc.) se pone a interactuar con suero de pacientes alérgicos que contiene inmunoglobulinas específicas contra determinados componentes alergénicos (anzuelo).

La identificación de las proteínas antigénicas o inmunoreactivas puede hacerse con ayuda de técnicas como la secuenciación de proteínas por el método de degradación de Edman (18,19) o por espectrometría de masas (17). A continuación, se debe demostrar que dichas proteínas generan una respuesta alérgica. Para lo anterior, se requiere obtener la proteína a estudiar con gran pureza; con frecuencia la obtención de esta proteína a partir del recurso natural es complicado debido a su baja abundancia. Como alternativa, a partir de las bases de datos de los genomas de un gran número de organismos secuenciados, se puede conocer el gen de dicho alergeno. Lo anterior permite diseñar oligonucleótidos específicos de dicho gen para amplificarlo después de que su RNA mensajero se aisle y retrotranscriba. Otra alternativa es utilizar la información del gen de interés para mandar a sintetizarlo en casas comerciales que se especializan en lo anterior. Una vez que se obtiene el gen de interés, se clona en un plásmido de expresión y se inserta en una bacteria como *Escherichia coli* para sintetizarla de forma recombinantes. Esta estrategia por lo general permite obtener grandes cantidades de la proteína en cuestión para realizar estudios funcionales y estructurales. La capacidad alergénica de las proteínas recombinantes se evalúa con técnicas como ELISA y Western blot usando el suero de pacientes alérgicos al organismo de donde la proteína proviene originalmente. Toda esta información permitirá al clínico tener mejores datos para realizar su diagnóstico molecular sobre los componentes alergénicos que afectan al paciente. Por ejemplo, la información permitirá conocer las características del alergeno, si se trata de un alergeno mayor o menor, uno especie-específico o panalergeno, si es un alergeno regional o descrito internacionalmente, o bien, si es una reacción por alergenos de reactividad cruzada, etc. Todo lo anterior permitirá iniciar la **medicina de precisión** cuya definición es *personalizar la práctica médica orientando individualmente las intervenciones terapéuticas* (4).

En este trabajo se presentarán dos casos de investigación en alergias alimentarias que ejemplifican el abordaje de la inmunoproteómica, ambos casos se estudiaron en población pediátrica. El primero es el caso de las alergias mediadas

por IgE a cuatro frutas, tres de ellas de la familia Rosaceae (manzana, pera y durazno) y una de la familia Musaceae. El segundo es un caso de alergia a las proteínas de leche de vaca no mediada por IgE, donde las inmunoglobulinas que intervienen en la reacción son las IgG subtipo 1 (IgG₁).

Alergia a las frutas

Las frutas son una importante fuente de vitaminas, minerales y fibra. Su ingesta puede llevarse a cabo a lo largo del día y de la semana. Por ejemplo, la manzana aporta gran cantidad de fibra, vitamina C, vitamina K, algunas vitaminas B y potasio; además, aporta pectina, fibra prebiótica que favorece a la microbiota intestinal. La pera aporta vitamina C y potasio. El durazno aporta también potasio, cantidades discretas de magnesio y yodo, así como provitamina A. El plátano aporta potasio, vitamina K, algunas vitaminas B, pectina y diferentes variedades de carbohidratos.

Para el caso de los lactantes, el proceso de ablactación, que implica el inicio de la introducción de alimentos no lácteos a la dieta, inicia con frutas como la manzana, la pera y el plátano. Después del primer año de vida del bebe, se comienza a incorporar a la dieta familiar nuevas frutas como el durazno, entre otras (20). Durante ese período, el bebé puede exponerse frecuentemente a estas frutas. Actualmente los alérgenos alimentarios pueden clasificarse en dos grandes grupos (21):

- **Alérgenos alimentarios clase I.** Se produce cuando existe una sensibilización primaria al alimento, donde las manifestaciones clínicas pueden variar desde leves hasta muy graves con la presencia de anafilaxia.
- **Alérgenos alimentarios clase II.** Se promueve cuando se trata de una sensibilización al alimento secundaria a reactividad cruzada, donde el sensibilizador primario proviene de una fuente alérgica inhalada como hongos, ácaros, polen de árboles, pastos, etc. A este evento se le conoce como síndromes de reactividad cruzada aeroalérgenos-alimentos. La gravedad de los síntomas también es variable.

Para las frutas, se ha observado que los alérgenos de la familia Rosaceae (manzana, durazno y pera) son del tipo Bet v 1 (Mal d 1 de manzana, Pru p 1 de durazno, Pyr c 1 de pera), profilinas (Mal d 4 y Pru p 4) y nsLTP (Mal d 3 y Pru p 3).

Estas proteínas alérgicas promueven reactividad cruzada por sensibilización secundaria a pólenes de árboles y pastos. En México, los pólenes que más frecuentemente producen la sensibilización primaria para los alérgenos señalados son el aliso común (*Alnus glutinosa*) y roble (*Quercus robur*), seguidos del abedul (*Betula verrucosa*), olivo (*Olea europea*), zacate (*Phleum pratense*) y aligustre (*Ligustrum vulgare*) (15). A este fenómeno de reactividad cruzada entre pólenes y frutas se le denomina síndrome polen-alimentos (15).

Para el caso del plátano, que pertenece a la familia Musaceae, contiene a las proteínas nsLTP1 (Mus a 3), quitinasa clase 1 (Mus a 2) y beta-1,3 glucanasa (Mus a 5). Estos componentes alérgicos también contribuyen a eventos de reactividad cruzada, el primer alérgeno con el maíz mientras que los otros dos con el látex promoviendo una manifestación clínica denominada síndrome látex-fruta (22). Además, ocasionalmente la alergia alimentaria produce una forma de presentación clínica denominada como síndrome de alergia oral (SAO), que se caracteriza por manifestaciones orofaríngeas que incluyen prurito y sensación de quemazón en los labios, boca y garganta; estos síntomas se presentan minutos después de la ingestión del alimento (14,15).

Como se ha señalado, todos estos alérgenos han sido descritos principalmente por grupos internacionales que incluyen las regiones de América del Norte (EUA y Canadá), Europa y Asia (8,11,12,23). Esta información funciona adecuadamente en pacientes mexicanos para realizar los diagnósticos y tratamientos por inmunoterapia. Sin embargo, para acceder a la medicina de precisión, es fundamental incluir información regional de los posibles alérgenos y panalérgenos existentes en nuestro país, a través del estudio con muestras de pacientes mexicanos. La utilidad de esta información es aún más relevante si se destaca el fenómeno de regionalización geográfica que tiene las alergias debido a múltiples factores como diferencias en hábitos alimenticios, medioambientales, étnicas y genéticas de nuestra población (8–11).

Por lo anteriormente expuesto, nuestro grupo tomó la iniciativa de realizar estudios de inmunoproteómica utilizando extractos de las cuatro principales frutas alérgicas en pacientes pediátricos: manzana, durazno, pera y plátano (13–15). Para lograr este objetivo, el primer punto fue la extracción de proteínas de las frutas a partir de una técnica con solventes, particularmente el fenol (24–26) que

incluyeron algunas modificaciones (27,28). Esta técnica ha sido muy eficiente para la obtención de extractos proteicos de manzana, durazno, pera y plátano, como puede observarse en los ensayos de SDS-PAGE (**Figura 1A**). En estas imágenes se muestra que existen diferencias importantes en los perfiles proteicos de cada fruta; además, se logra observar que existen gran cantidad de proteínas de bajo, medio y alto peso molecular indicando una gran integridad de las muestras. El ensayo de SDS-PAGE permite separar a las proteínas de forma desnaturalizada por sus pesos moleculares, sin embargo, en cada banda podría estar presente un gran número de proteínas con masas similares. Para obtener una mejor separación de los extractos, se llevó a cabo el corrimiento electroforético por geles de dos dimensiones (geles-2D). En esta técnica, las proteínas se separan primero por sus propiedades de

carga intrínseca (punto isoeléctrico, pI) introduciéndolas a un gel con un gradiente de pH. Posteriormente, las proteínas separadas por pI ahora se separan por su peso molecular, el resultado es un gel de poliacrilamida repleto de manchas donde cada una correspondería a unas pocas proteínas.

La **Figura 1** muestra los geles-2D de los extractos proteicos de manzana, durazno, pera y plátano (**Fig. 1 B, C, D y E, respectivamente**).

Como puede apreciarse, cada uno de los perfiles de geles-2D son diferentes sugiriendo diferencias entre las expresiones de proteínas para cada fruta. Para determinar las proteínas inmunoreactivas de las frutas, se realizaron ensayos de Western blot. Consiste en transferir las proteínas del gel (SDS-PAGE o geles-2D) hacia una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF); posteriormente, las membranas se

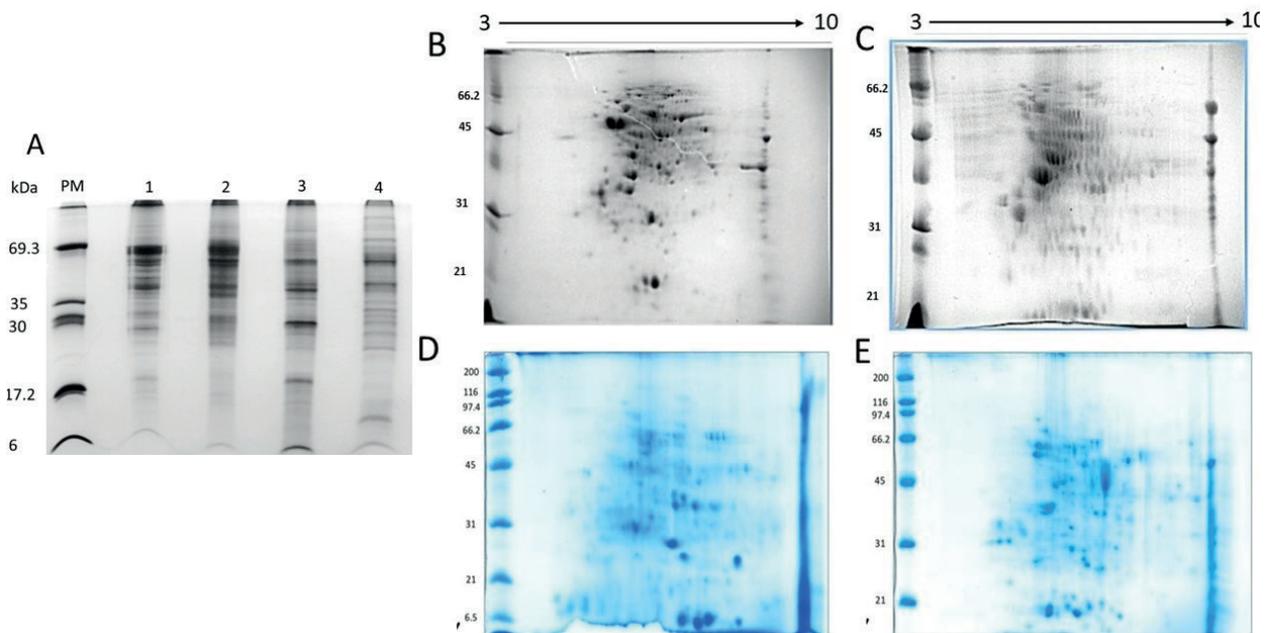


Figura 1. Ensayos electroforéticos de los extractos de frutas. (A) SDS-PAGE al 12% de acrilamida y 13% de glicerol de extractos de proteína de diferentes frutas. Cada carril contiene lo siguiente: PM: marcador de pesos moleculares; (1) 15 μ g manzana; (2) 15 μ g pera; (3) 15 μ g durazno; (4) 15 μ g plátano. Geles-2D de extractos de proteína de frutas. El intervalo de pH es de 3-10, 12% acrilamida y 13% glicerol. (B) manzana; (C) durazno; (D) pera; (E) plátano.

incubaban con el anticuerpo del paciente alérgico a la fruta. En los estudios de las frutas, se analizó la alergia mediada por IgE. A continuación, la membrana se incubó con un segundo anticuerpo anti-IgE de humano conjugado con peroxidasa; lo anterior permitió revelar la membrana por una técnica muy sensible, quimioluminiscencia.

Alergia a la manzana

Hasta el momento de este manuscrito, los pacientes que se lograron reclutar fueron alérgicos a la manzana, durazno, pera y plátano en el Servicio de Alergias del INP. Estos pacientes cumplieron con una serie de requisitos para incluirse en el estudio, como ser paciente de cualquier género, con edad

de entre 3 a 16 años con diagnóstico clínico de alergia a las frutas. Contar con historial clínico exhaustivo que incluyera hábitos alimenticios, información relevante de sus parientes cercanos como probables alergias de algún tipo (atopia). También debería contar con un estudio de sintomatología sistémica inmediatamente después del consumo de frutas como la posible presencia de síntomas cutáneos (dermatitis atópica, urticaria o angioedema), síntomas respiratorios (rinitis alérgica o asma), SAO u otros síntomas (oftálmicas como conjuntivitis alérgica o síntomas gastrointestinales). Adicionalmente, los pacientes deberían tener estudios que comprobaran la alergia, tales como pruebas de reto oral, dermatológicas o estudios de IgE específicos contra frutas. En este trabajo se excluyeron a pacientes que estuvieran bajo

tratamiento con inmunosupresores, como esteroides u otros, pacientes con enfermedades crónicas u otras condiciones que pudieran confundir la interpretación del diagnóstico de alergia a la manzana.

Se reclutaron 26 pacientes donde la distribución entre niñas y niños fue del 50%, el intervalo de edad fue de 3 a 16 años (**Cuadro II**).

Dentro de los antecedentes más relevantes son que inmediatamente después de consumir frutas (manzana, pera, durazno o plátano), el 45% de los pacientes presentaron manifestaciones respiratorias en forma de rinitis alérgica y el 20 % presentaron asma, mientras que el 23% presentaron manifestaciones cutáneas (dermatitis). Además, la confirmación de la alergia se realizó con prueba cutánea o

Cuadro II. Características demográficas de los pacientes con alergia a las frutas*

VARIABLE	VALORES	
Edad (años)	26 pacientes (3-16)	
	N	%
Género		
Femenino	13	50
Masculino	13	50
Manifestaciones clínicas		
Rinitis alérgica	12	45
Asma	5	20
Dermatitis	6	23
Prueba cutánea positiva		
Manzana	10	39
Durazno	7	28
Pera	6	22
Plátano	3	11
Prueba reto oral positivo		
Manzana	10	37
Durazno	7	28
Pera	4	16
Plátano	5	19
Antecedentes de atopia familiar	20	77

* Los datos se obtuvieron de Fernández-Molina 2023

de reto oral para cada fruta. El 77% de los pacientes tuvieron antecedentes de atopía familiar.

Las muestras de suero sanguíneo de los pacientes se evaluaron contra extractos de proteína de manzana en Western blots (Fig. 2A). Como se puede apreciar, sólo 16 pacientes fueron reactivos contra dicho extracto (1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 24 y 26). Algunos sueros reaccionaron contra más de una banda sugiriendo la existencia de diferentes proteínas inmunoreactivas. Por otra parte, los sueros que no reaccionaron podrían deberse a que el extracto de manzana no contiene las proteínas antigénicas para éstos, sugiriendo que los sueros de pacientes que no reaccionaron, serían reactivos a proteínas que sólo se localizan en la pera, durazno o plátano. Actualmente, se están realizando estudios de Western blot

para estas tres frutas. Con relación a los sueros reactivos contra manzana, el siguiente paso fue generar un pool de ellos para realizar Western blot con los geles-2D. La Figura 2B muestra un resultado representativo del ensayo donde se realizó un Gel-2D que se tiñó con Coomassie coloidal; un duplicado de ese gel se transfirió a membrana de PVDF para Western blot y detectar las proteínas inmunoreactivas (Fig. 2C).

A partir del Gel-2D se tomaron los spots inmunoreactivos para su identificación por espectrometría de masas. Se detectaron cuatro principales spots inmunoreactivos, los cuales se identificaron como el alérgeno principal de manzana Mal d 1 (spot 1), nucleótido difosfato cinasa (spot 2), proteína ácida ribosomal (spot 3) y glutatión transferasa (spot 4) (Cuadro III).

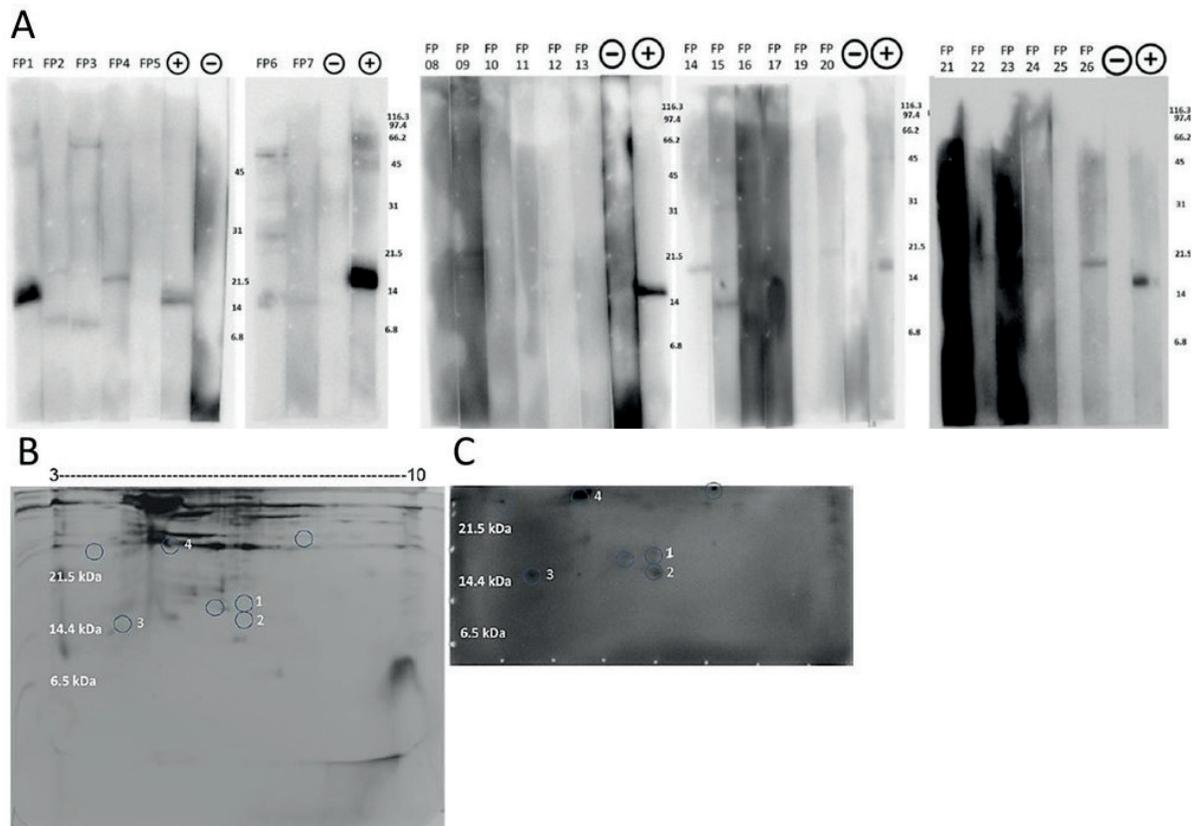


Figura 2. Detección de proteínas inmunoreactivas a IgE específicas de extracto de manzana utilizando muestras de suero de pacientes alérgicos a manzana. (A) Western blot de SDS-PAGE; (B) Gel-2D de extracto de manzana; (C) Western de Gel-2D, los círculos señalan dónde se encuentran las proteínas inmunoreactivas que fueron cortados en el Gel-2D para identificarse por espectrometría de masas. Datos obtenidos de Fernández-Molina 2023.

A continuación, se describen las características de cada proteína identificada.

Mal d 1. Esta proteína pertenece a las PR-10 (proteína relacionada con patogénesis-10). Mal d 1 pesa 17.5 kDa y es el principal alérgeno de manzana, como se ha señalado, se relaciona con reactividad cruzada (Alérgenos alimentarios

clase II) con el abedul, específicamente con su alérgeno Bet v 1; es el componente molecular que suele ser el sensibilizador primario y tiene una identidad de secuencia aminoácil mayor al 80% con Mal d 1. De forma interesante, un grupo importante de pacientes presentaron reactividad contra este alérgeno.

Cuadro III. Proteínas de manzana identificadas como antigénicas*

No. Spot	Proteína	PM(kDa)/ pI	Nomenclatura de alérgeno	Código Uni-prot
1	PR-10	16.6/5.5	Mal d 1	Q9S7M5
2	Nucleótido difosfato cinasa	16.5/6.4	No descrita	A0A498JEZ2
3	Proteína ácida de ribosoma 60S	12/4.2	No descrita	A0A498HLF4
4	Glutación transferasa	27/5.3	No descrita	A0A498HW70

*Los datos se obtuvieron de Fernández-Molina 2023

Nucleótido difosfato cinasa. Esta enzima tiene un peso molecular de 15.3 kDa y cataliza la hidrólisis de ATP a ADP participando en la biosíntesis de CTP, GTP y UTP. Esta enzima no se ha reportado como alérgeno en manzana; sin embargo, se ha reportado como posible alérgeno en el salmón (29).

Proteína ácida de ribosoma 60S. Tiene un peso molecular de 12 kDa y participa en el paso de elongación de la síntesis de proteínas. Esta proteína tampoco se ha reportado como alérgeno en manzana, sin embargo, tiene una identidad aminoácil del 41% con Pru du 5, un alérgeno de la almendra.

Glutación transferasa (GST). Esta enzima está involucrada en el metabolismo de la detoxificación de xenobióticos. Tampoco se ha reportado como alérgeno en manzana, sin embargo, tiene una identidad del 25% con las GST de cucaracha (Per a 5) y abedul (Bet v 8). Esto sugiere que su antigenicidad podría deberse a una reactividad cruzada con cualquiera de estos organismos.

Alergia a la proteína de la leche

La leche es el alimento más importante durante la etapa de lactancia. La leche de seno materno es esencial para el

crecimiento del lactante y contiene todos los nutrientes para esta etapa. La leche materna en raras ocasiones promueve alergia, sin embargo, se ha demostrado que, si la madre consume leche de vaca, algunos péptidos de la beta-lactoglobulina pueden presentarse en la leche materna y generar una reacción alérgica en lactantes sensibilizados (21). Como se ha señalado, la alergia a la leche de vaca (APLV) es el alimento más alérgico en la población pediátrica (16). Diversos factores incrementan su frecuencia, como falta de lactancia materna o la incorporación temprana de fórmulas lácteas derivadas de vaca durante la lactancia y antecedentes familiares de alergias (10). En Europa, la prevalencia de APLV es del 1.7%, mientras que en EUA, la prevalencia en niños es del 2%; sin embargo, este valor se incrementa al doble en el grupo menor a los dos años (11,12). En México, no se cuenta con valores epidemiológicos, sin embargo, se sabe que su frecuencia se incrementa también en menores de dos años (13). En la base de datos de la WHO/IUIS, se reportan ocho componentes alérgicos de la leche de vaca (Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 8, Bos d 9, Bos d 10, Bos d 11, y Bos d 12); adicionalmente, también se considera alérgica a la lactoferrina (Bos d lactoferrina). Como se ha señalado anteriormente, tales componentes alérgicos se identificaron con muestras de pacientes de América del norte, incluyendo a Canadá y EUA, así como países de Europa y Asia, existiendo una escasa información de los alérgenos más

importantes en nuestra población, o bien, de la existencia de alérgenos nuevos o regionales en México. Por tanto, se desarrolló el estudio inmunoproteómico en APLV. Nuestro estudio involucró a 34 pacientes pediátricos con intervalos de edad de entre 1 y 15 meses.

Las principales manifestaciones clínicas fueron gastrointestinales de las cuales, el 75% se clasificaron como no mediadas por IgE (30,31). En este estudio, no se hicieron

pruebas confirmatorias de APLV como la prueba de reto oral, sin embargo, todas las manifestaciones clínicas de los pacientes se eliminaron cuando fueron alimentados con fórmulas lácteas extensamente hidrolizadas. Este resultado sugiere que los pacientes son efectivamente alérgicos a la leche de vaca.

Utilizando técnicas de precipitación y cromatografía de intercambio iónico, se obtuvo un extracto de proteínas

Cuadro IV. Características demográficas de los pacientes con alergia a la leche de vaca*

VARIABLE	VALORES	
Edad (meses)	34 pacientes (1-15)	
	N	%
Género		
Femenino	15	44
Masculino	19	56
Manifestaciones clínicas		
Reflujo gastroesofágico	22	65
Vómito	20	59
Cólico	7	21
Diarrea	12	35
Hematoquecia	8	23
Disquecia	17	50
Distensión abdominal	14	41
Desnutrición	18	53
Esofagitis eosinofílica	10	29
Gastropatía eosinofílica	9	27
Duodenitis eosinofílica	10	29
Dermatitis atópica	78	23
Rinitis alérgica	5	15
Broncoespasmo	5	15
Tos crónica	4	12
Laringoespasmo	3	9
Anemia	6	18
Dermatitis	8	23
Antecedentes de atopia familiar	19	56
Consumo de fórmula láctea	31	92

*Los datos se obtuvieron de Torres-Arroyo 2023

de la leche de vaca baja en grasas y caseínas; lo anterior permitió obtener un gran enriquecimiento de proteínas de baja abundancia dividido en cinco principales fracciones cromatográficas (**Figura 3**) (10).

Utilizando estas fracciones se realizó un análisis serológico de los pacientes encontrando que todos presentaban ausencia de

IgE específicas contra proteínas de la leche. Este dato confirmó que nuestros pacientes presentaban APLV no mediada por IgE. El análisis de anticuerpos específicos a las fracciones de leche se extendió para las IgG y sus subtipos (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄). El resultado mostró que la subclase IgG₁ se incrementa significativamente en los pacientes con APLV.

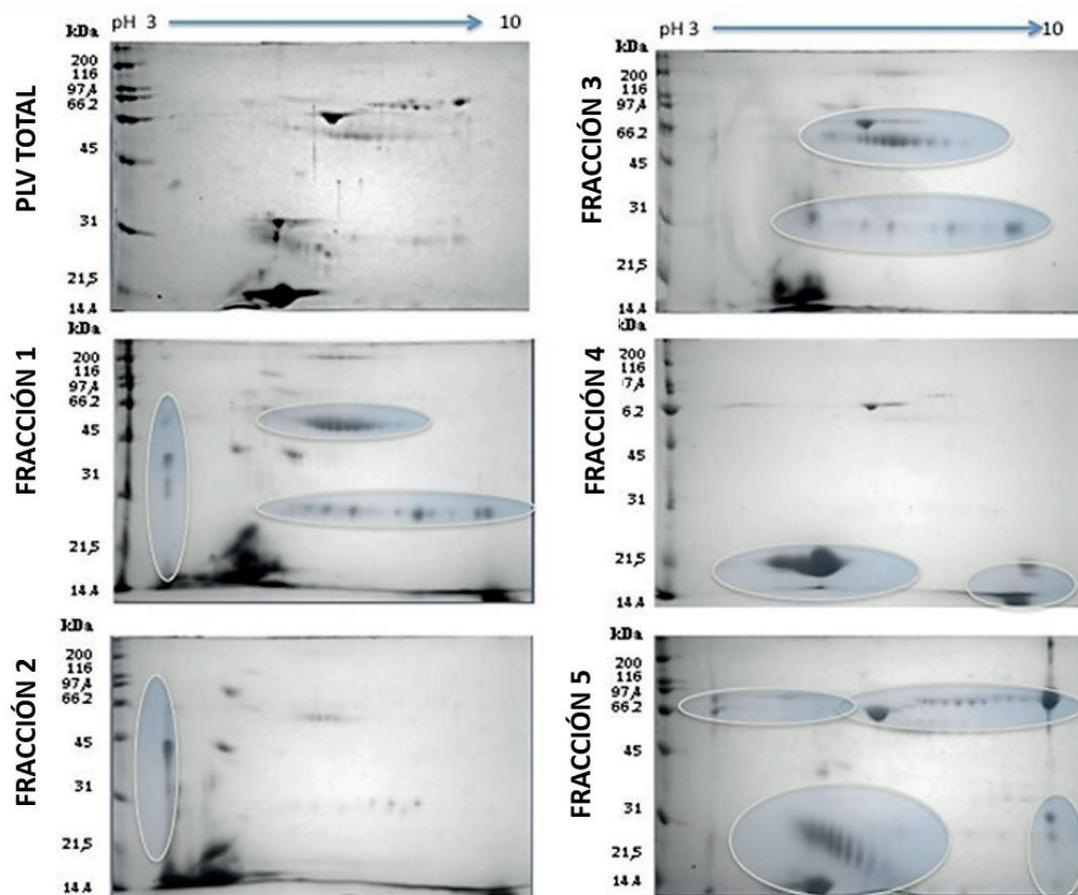


Figura 3. Geles-2D del extracto total de leche de vaca y de las cinco fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico. Los círculos dentro de cada gel-2D ilustran las proteínas enriquecidas en cada fracción. Datos obtenidos de Torres-Arroyo 2023.

Esto es relevante pues existen reportes de su participación en la respuesta alérgica, lo cual se abordará más adelante. Con el interés de determinar si estas inmunoglobulinas se generaron selectivamente contra componentes moleculares de la leche, se realizó la inmunoproteómica contra las fracciones enriquecidas de la leche de vaca, utilizando un pool de sueros de pacientes.

La **Figura 4** muestra los Western blots obtenidos de los geles-2D para las fracciones 3, 4 y 5 de leche de vaca, las cuales fueron las más inmunoreactivas. Como se observa, en las tres fracciones se obtuvo un número importante

de spots dando un total de 44, mientras que los controles presentaron reacciones escasas o nulas, sugiriendo que las reacciones fueron específicas. A partir de geles-2D que se corrieron en duplicado con aquellos que se transfirieron para los ensayos Western blot, se cortaron los spots para realizar su identificación por espectrometría de masas. El **cuadro V** muestra el resultado de la identificación de los spots obtenidos en las tres fracciones, donde se obtuvieron 11 proteínas no redundantes. Esto significa que un número importante de proteínas se localizaron en más de un spot con diferente punto isoeléctrico sugiriendo que la mayoría

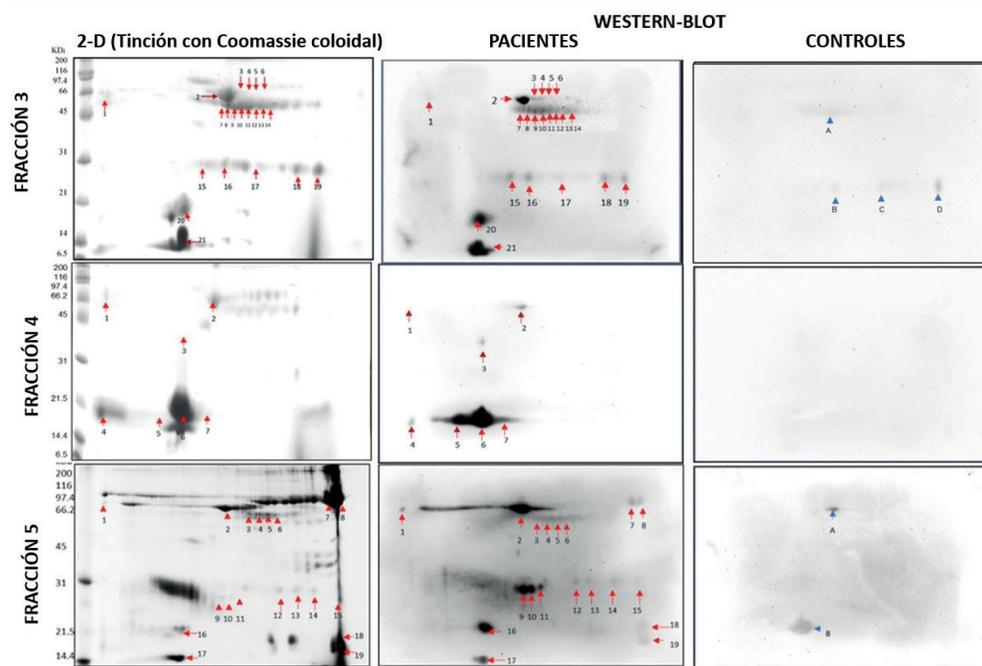


Figura 4. Localización en Geles-2D de las proteínas inmunoreactivas de las fracciones de leche 4, 5 y 6 mediante ensayos de Western blot 2D revelados por IgG1 específicas. Las flechas ilustran las proteínas inmunoreactivas y se cortaron en los Geles-2D para su identificación por espectrometría de masas. Datos obtenidos de Torres-Arroyo 2023.

Cuadro V. Proteínas de leche de vaca identificadas como antigénicas*

No. Spot	Proteína	Nomenclatura de alérgeno	Código Uniprot
1-14 ^a	Albumina	Bos d 6	P02769
1-2 ^b			
1-6 ^c			
16 ^a	Proteína 2 similar a β-lactamasa	No descrita	Q1LZ83
18-19 ^a	Caseína α-S2	Bos d 10	P02663
20 ^a	β-lactoglobulina	Bos d 5	P02754
4-7 ^b			
17 ^c			
21 ^a	α-lactalbúmina	Bos d 4	P00711
18 ^c			
7 ^c	Lactotransferrina	Bos d LF	P24627
8 ^c	Lactoperoxidasa	Bos d lactoperoxidasa	P80025
9 ^c	Caseína α-S1	Bos d 9	P02662
15 ^a	β-Caseína	Bos d 11	P02666
10-11 ^c			
17 ^a	κ-Caseína	Bos d 12	P02668
13 ^c			
19 ^c	Angiogenina	No descrita	P10152

*Los datos se obtuvieron de Torres-Arroyo 2023

^aNumeración tomada de la Figura 4, fracción 3

^bNumeración tomada de la Figura 4, fracción 4

^cNumeración tomada de la Figura 4, fracción 5

presenta proteoformas con modificaciones postraduccionales que modifican sus cargas

De forma interesante, se encontraron nueve proteínas reportadas anteriormente como alérgenos: Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d 9, Bos d 10, Bos d 11, Bos d 12, y Bos d lactoferrina. Además, se identificó una proteína reportada como antigénica, la lactoperoxidasa (29). Adicionalmente, identificamos dos nuevas proteínas inmunoreactivas no reportadas hasta ahora, la angiogenina y la proteína 2 similar a la beta lactamasa.

Aunque la relevancia de la IgG₁ específica como marcador alérgico ha sido muy poco apreciada (3), recientemente el grupo de Jiménez-Saiz ha cambiado el panorama. Este grupo encontró que durante los estados tempranos de la exposición a un alérgeno, el desarrollo de células de memoria inmaduras tipo B específicas para alérgenos IgG₁⁺ (IgG₁⁺ MBCs, por su siglas en inglés) precede a la generación de la respuesta a IgE; por tanto, cuando el paciente se vuelve a exponer al alérgeno y se contiene en el medio interleucinas tipo IL-4 e IL-13, las IgG₁⁺ MBCs pueden transformarse en células productoras de IgE específicas suplementando al medio con esta inmunoglobulina (32,33). Por tanto, la presencia de IgG₁ específicas contra alérgenos podría ser marcador temprano para predecir riesgo a desarrollar alergias mediadas por IgE (34). Además, esta información contribuye a comprender los mecanismos etiopatológicos que subyacen en la alergia no mediada por IgE. Actualmente, se están llevando a cabo estudios dirigidos a demostrar esta hipótesis.

Hasta donde tenemos conocimiento, estos son los primeros estudios relacionados con la búsqueda de los alérgenos más frecuentes de la leche de vaca, así como de potenciales nuevos alérgenos a partir de un enfoque inmunoproteómico.

Comentarios finales

Como se ha señalado, las alergias son enfermedades crónicas que comprometen la calidad de vida del paciente e incluso, puede poner en riesgo su vida cuando se llega a la anafilaxia; son un problema de salud pública y su tendencia a nivel mundial ha sido a incrementarse (7,30). Además, las alergias presentan un componente geográfico derivado de diversos factores como los ambientales, hábitos alimenticios y genéticos. Adicionalmente, las bases de datos internacionales de alérgenos identificados contienen

información principalmente de países como EUA, Canadá, países europeos y asiáticos, careciendo substancialmente de alérgenos identificados en Latinoamérica. Más aún, estudios epidemiológicos sobre las alergias y los componentes moleculares que las promueven en población latinoamericana, son escasos. La información que se obtenga permitirá la obtención de mejores diagnósticos de certeza y optimizar tratamientos de inmunoterapia.

En los dos casos que se han descrito, es necesario demostrar que las proteínas identificadas como inmunorreactivas, sean efectivamente alérgicas. Para lo anterior, la biología molecular asiste a la demostración de la alérgenicidad permitiendo obtener proteínas recombinantes a partir de bacterias. En la actualidad, se está realizando la extracción de RNA total y la obtención de cDNA para clonar los genes de las proteínas inmunoreactivas.

Referencias

1. World Health Organization (2002) Prevention of allergy and allergic asthma. *WHO/MNC/CRA/03.2*.
2. Rodríguez-Romero, A., García-Ramírez, B., and Ramírez-Rodríguez, M. A. (2022) Capítulo 1. Propiedades moleculares de los alérgenos. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. **31**, 18–41.
3. Calvani, M., Anania, C., Cuomo, B., D'Auria, E., Decimo, F., Indirli, G. C., Marseglia, G., Mastroianni, V., Sartorio, M. U. A., Santoro, A., and Veronelli, E. (2021) Non-IgE- or Mixed IgE/Non-IgE-Mediated Gastrointestinal Food Allergies in the First Years of Life: Old and New Tools for Diagnosis. *Nutrients*. **13**, 226.
4. Rodríguez-González, M. (2022) Introducción. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. **31**, 13–17.
5. Chapman, M. D., Pomés, A., Breiteneder, H., and Ferreira, F. (2007) Nomenclature and structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **119**, 414–420.
6. Pomés, A., Davies, J. M., Gadermaier, G., Hilger, C., Holzhauser, T., Lidholm, J., Lopata, A. L., Mueller, G. A., Nandy, A., Radauer, C., Chan, S. K., Jappe, U., Kleine-Tebbe, J., Thomas, W. R., Chapman, M. D., van Hage, M., van Ree, R., Vieths, S., Raulf, M., and Goodman, R. E. (2018) WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Mol Immunol*. **100**, 3–13.
7. Ogulur, I., Pat, Y., Ardicli, O., Barletta, E., Cevhertas, L., Fernandez-Santamaria, R., Huang, M., Bel Imam, M., Koch, J., Ma, S., Maurer, D. J., Mitamura, Y., Peng, Y., Radzikowska, U., Rinaldi, A. O., Rodriguez-Coira, J., Satitsuksanoa, P., Schneider, S. R., Wallimann, A., Zhakparov, D., Ziadlou, R., Brüggem, M. C., van de Veen, W., Sokolowska, M., Baerenfaller, K., Zhang, L., Akdis, M., and Akdis, C. A. (2021) Advances and highlights in biomarkers of allergic diseases. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **76**, 3659–3686.
8. Durban, R., Groetch, M., Meyer, R., Coleman Collins, S., Elverson, W., Frieber, A., Kabourek, J., Marchand, S. M., McWilliam, V., Netting, M., Skypala, I., Van Brennan, T., Vassilopoulou, E., Vlieg-Boerstra, B., and Venter, C. (2021) Dietary Management of Food Allergy. *Immunol Allergy Clin North Am*. **41**, 233–270.
9. Wai, C. Y. Y., Leung, N. Y. H., Leung, A. S. Y., Ngai, S. M., Pacharn, P., Yau, Y. S., Rosa Duque, J. S. Da, Kwan, M. Y. W., Jirapongsananuruk, O., Chan, W. H., Chua, G. T., Lee, Q. U., Piboonpocanun, S., Ho, P. K., Wong, J. S. C., Li, S., Xu, K. J. Y., Wong, G. W. K., Chu, K. H., Leung, P. S. C., Vichayanond, P., and Leung, T. F. (2022) Comprehending the al-

- lergen repertoire of shrimp for precision molecular diagnosis of shrimp allergy. *Allergy*. 10.1111/all.15370.
10. Torres-Arroyo, A., Martínez-Aguilar, J., Castillo-Villanueva, A., Zárate-Mondragón, F., Cervantes-Bustamante, R., Patiño-López, G., Medina-Contreras, O., Espinosa-Padilla, S. E., Valencia-Rojas, S., Romero-Guzmán, L., Oria-Hernández, J., and Reyes-Vivas, H. (2023) Immunoproteomics of cow's milk allergy in Mexican pediatric patients. *J Proteomics*. **273**, 104809.
 11. Boye, J. I. (2012) Food allergies in developing and emerging economies: need for comprehensive data on prevalence rates. *Clin Transl Allergy*. **2**, 25.
 12. Ben-Shoshan, M., Harrington, D. W., Soller, L., Fragapane, J., Joseph, L., St Pierre, Y., Godefroy, S. B., Elliot, S. J., and Clarke, A. E. (2010) A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **125**, 1327–1335.
 13. Ruiz Segura, L. T., Figueroa Pérez, E., Nowak-Wegrzyn, A., Siepmann, T., and Larenas-Linnemann, D. (2020) Food allergen sensitization patterns in a large allergic population in Mexico. *Allergol Immunopathol (Madr)*. **48**, 553–559.
 14. Rodríguez-Mireles, K. A., Gaspar-López, A., López-Rocha, E. G., Del Rivero-Hernández, L., and Segura-Méndez, N. H. (2014) Revista Alergia México. *Rev Alerg Mex*. **61**, 65–72.
 15. Azamar-Jácome, A. A., Azamar-Jácome, M. A., Borjas-Aguilar, K. L., Mendoza-Hernández, D. A., and Huerta-López, J. G. (2017) Clinical-epidemiological profile of oral allergy syndrome in the population aged 6 to 18 years. *Rev Alerg Mex*. **64**, 142–152.
 16. Toro-Monjaraz, E. M., Fonseca-Camarillo, G., Zárate-Mondragón, F., Montijo-Barrios, E., Cadena-León, J., Avelar-Rodríguez, D., Ramírez-Mayans, J., Cervantes-Bustamante, R., and Yamamoto-Furusho, J. K. (2021) Differential Cytokine Expression in the Duodenum and Rectum of Children with Non-Immunoglobulin E-Mediated Cow's Milk Protein Allergy. *Dig Dis Sci*. **66**, 3769–3775.
 17. Torres-Arroyo, A., Ruiz-Lara, A., Castillo-Villanueva, A., Méndez-Cruz, S. T., Espinosa-Padilla, S. E., Espinosa-Rosales, F. J., Zárate-Mondragón, F., Cervantes-Bustamante, R., Bosch-Canto, V., Vizzuett-López, I., Ordaz-Fávila, J. C., Oria-Hernández, J., and Reyes-Vivas, H. (2017) Proteomics: a tool to develop novel diagnostic methods and unravel molecular mechanisms of pediatric diseases. *Bol Med Hosp Infant Mex*. **74**, 233–240.
 18. Edman, P. (1950) Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem Scand*. **4**, 283–293.
 19. Edman, P., and Begg, G. (1967) A protein sequenator. *European Journal Biochemistry*. **1**, 80–91.
 20. Guía para la correcta ablactación <https://www.actuamed.com.mx/informacion-pacientes/guia-para-la-correcta-ablactacion>.
 21. Vega-Díaz, T. L., Torres-Huerta, K. N., Sánchez-León, M. del C., Rojo-Gutiérrez, M. I., Rivero-Yeverino, D., Ramírez-Alejandri, A. E., Pozo-Beltrán, C. F., Partida-Gaytán, A., Ortega-Martell, J. A., Ortega-Jordá Rodríguez, E., Navarro-González, P. I., Navarrete-Rodríguez, E. M., Nava-Ramírez, C. I., Huerta-Villalobos, Y. R., González-Uribe, V., González-Tuyub, Y. H., González-Luna, R. H., González-Íñiguez, K. D., Gómez-Meza, M. del R., García-Chávez, M., Díaz-Mina, E. F., Del Río-Navarro, B. E., Costa-Domínguez, M. del C., Cerda-Reyes, S., Castell-Toledo, M. S., Campos-Téllez, H. H., Azamar-Jácome, A. A., Arroyo-Rojano, M. I., and Rodríguez-González, M. (2022) Capítulo 4. Alergia alimentaria. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. **31**, 91–137.
 22. Costa-Domínguez, M. del C., and Macías-Garza, J. E. (2022) Capítulo 6. Alergia al látex. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. **31**, 145–150.
 23. Gupta, R. S., Warren, C. M., Smith, B. M., Blumenstock, J. A., Jiang, J., Davis, M. M., and Nadeau, K. C. (2018) The Public Health Impact of Parent-Reported Childhood Food Allergies in the United States. *Pediatrics*. **142**, 1–12.
 24. Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., and Panis, B. (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. in *Proteomics*, pp. 2497–2507, **5**, 2497–2507.
 25. Faurobert, M., Pelpoir, E., and Chaïb, J. (2007) Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. in *Plant Proteomics*, pp. 9–14, Humana Press, New Jersey, **135**, 9–14.
 26. Jiang, L., Zhang, L., Shi, Y., Lu, Z., and Yu, Z. (2014) Proteomic analysis of peach fruit during ripening upon post-harvest heat combined with 1-MCP treatment. *J Proteomics*. **98**, 31–43.
 27. Delgado Gómez, H. O. (2018) *Perfil proteómico de extractos de proteínas en plátano (Musa paradisiaca) y pera (Pyrus communis)*. Licenciatura thesis, UNAM, CDMX
 28. Fernández Molina, A. E. (2022) *Inmunoproteómica de la alergia alimentaria en pacientes pediátricos*. Maestría en Ciencias Bioquímicas thesis, UNAM, CDMX
 29. Mari, A., Rasi, C., Palazzo, P., and Scala, E. (2009) Allergen Databases: Current Status and Perspectives. *Curr Allergy Asthma Rep*. **9**, 376–383.
 30. Boyce, J. A., Assa'ad, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., Wood, R. A., Plaut, M., Cooper, S. F., and Fenton, M. J. (2010) Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Report of the NIAID-sponsored expert panel. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 10.1016/j.jaci.2010.10.007.
 31. Lozinsky, A. C., Meyer, R., De Koker, C., Dziubak, R., Godwin, H., Reeve, K., Dominguez Ortega, G., and Shah, N. (2015) Time to symptom improvement using elimination diets in non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies. *Pediatric Allergy and Immunology*. **26**, 403–408.
 32. Jiménez-Saiz, R., Bruton, K., Koenig, J. F. E., Wasserman, S., and Jordana, M. (2018) The IgE memory reservoir in food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **142**, 1441–1443.
 33. Jiménez-Saiz, R., Ellenbogen, Y., Koenig, J. F. E., Gordon, M. E., Walker, T. D., Rosace, D., Spill, P., Bruton, K., Kong, J., Monteiro, K., Wen, J., Tuomanen, E. I., Kolbeck, R., Chu, D. K., Wasserman, S., and Jordana, M. (2019) IgG1 + B-cell immunity predates IgE responses in epicutaneous sensitization to foods. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **74**, 165–175.
 34. Jiménez-Saiz, R., Ellenbogen, Y., Bruton, K., Spill, P., Sommer, D. D., Lima, H., Wasserman, S., Patil, S. U., Shrefflere, W. G., and Jordana, M. (2019) Human BCR analysis of single-sorted, putative IgE+ memory B cells in food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. **144**, 336–339.



DR. HORACIO REYES VIVAS
ORCID: 0000-0002-3604-9629.

Estudió Biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realizó su Licenciatura y Maestría en Ciencias Biológicas bajo la tutoría del Dr. Edmundo Chávez Cossio llevando a cabo investigación en Mitocondriología y Bioenergética. Posteriormente, realizó su Doctorado en Ciencias bajo la tutela del Dr. Armando Gómez Puyou donde estudió la función y estructura de enzimas. Es ahí donde se interesó profundamente por las enzimas y proteínas. A partir del 2000, se incorporó al Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría, donde se ha dedicado al estudio de proteínas con interés biomédico. Las dos principales Líneas de Investigación son el diseño de fármacos antiparasitarios y el estudio por inmunoproteómica de alérgenos donde ha tenido la oportunidad de colaborar con colegas y amigos. Actualmente es miembro del SNI nivel 3.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 36-46

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Las modificaciones postraduccionales de la triosafosfato isomerasa de humano la hacen un potencial objetivo farmacológico contra el cáncer.

Post-translational modifications of human triosephosphate isomerase make it a potential anticancer drug target.

Enríquez-Flores, Sergio^{1*}; De la Mora-De la Mora, Ignacio¹; García-Torres, Itzhel¹; Flores-López, Luis Antonio²; Martínez-Pérez, Yoalli³ y López-Velázquez, Gabriel ¹.

¹ Laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil. Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud. Ciudad de México, México.

² Laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil, CONAHCYT-Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México.

³ Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Campus Ciudad de México, México.

*Correspondencia: Laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil, Instituto Nacional de Pediatría, Av. Insurgentes Sur 3700-C, Insurgentes Cuicuilco, Alcaldía Coyoacán, CDMX (México), C.P. 04530 Tel. +52 (55) 1084-0900 Ext 1726, sergioenriquez@ciencias.unam.mx

Resumen

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se forman debido al crecimiento descontrolado de las células en el cuerpo humano. A nivel mundial las estadísticas indican que es una de las enfermedades que más aquejan al ser humano y conforme avanzan los años, hay aumento considerable de casos, principalmente en países en desarrollo como el nuestro. Hay una gran cantidad de medicamentos que se usan actualmente, desde agentes quimioterapéuticos, inmunoterapia, trasplante de órganos, entre otros. Estos pueden llegar a causar efectos secundarios muy severos y en algunos casos existe la remisión y avance de la enfermedad con consecuencias graves. Dentro de las características que presentan las células cancerosas se encuentra una actividad glucolítica aumentada y en algunos casos pueden llegar a tener gran dependencia de esta vía metabólica. La triosafosfato isomerasa es la quinta enzima de la vía glucolítica importante en la producción neta de ATP. Se conoce la estructura y función de esta enzima en una gran cantidad de especies lo que ayuda a un entendimiento más integral de la misma. Particularmente se han descrito algunos eventos postraduccionales que suceden en la

Abstract

Cancer is a group of diseases that are formed due to the uncontrolled growth of cells in the human body. Worldwide statistics indicate that it is one of the diseases that most afflict human beings and as the years go by, there is a considerable increase in cases, mainly in developing countries such as México. There are a large number of drugs that are currently used, from chemotherapeutic agents, immunotherapy, organ transplantation, among others. These can cause very severe side effects and in some cases, there is remission and progression of the disease with serious consequences. Among the characteristics of cancer cells is an increased glycolytic activity and they can become highly dependent on this metabolic pathway. Triosephosphate isomerase is the fifth enzyme of the glycolytic pathway and is important for net ATP production. The structure and function of this enzyme is known in a large number of species which contributes to a more comprehensive understanding of this enzyme. Particularly, some posttranslational events have been described that occur in human triosephosphate isomerase in which important functional and structural

triosafosfato isomerasa de humano en los cuales se provocan alteraciones funcionales y estructurales importantes. Esto ha sido considerado como una ventana de oportunidades dadas las diferencias que pueden existir entre las células cancerosas y su contraparte en células normales con respecto a la enzima glucolítica. El presente trabajo pretende demostrar que estas modificaciones postraduccionales, pueden tomarse como eje para estudio entre la enzima no modificada postraduccionalmente y la que ha sido modificada dadas las potenciales diferencias estructurales. Finalmente se dan elementos para considerar el estudio profundo de la triosafosfato isomerasa en condiciones de modificación postraduccionales para generar propuestas que ayuden con mejores herramientas para el desarrollo de compuestos con potencial farmacológico con gran selectividad.

Palabras clave: Glucólisis, desamidación, fosforilación, S-nitrosilación, modificación postraduccionales.

alterations are provoked. This has been considered as a window of opportunity given the differences that may exist between cancer cells and their counterpart in normal cells with respect to the glycolytic enzyme. The present work aims to demonstrate that these post-translational modifications can be taken as a pivot for study between the enzyme that has not been post-translationally modified and the one that has been modified given the potential structural differences. Finally, elements are given to consider the deep study of triosephosphate isomerase under post-translational modification conditions to generate proposals that help with better tools for the development of compounds with pharmacological potential and high selectivity.

Keywords: Glycolysis, deamidation, phosphorylation, S-nitrosylation, post-translational modification.

El cáncer como una enfermedad de impacto negativo en la salud a nivel mundial

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un conjunto de enfermedades que tienen su origen en procesos relacionados con el crecimiento y la diseminación celular descontrolados, lo que puede afectar de forma leve hasta muy grave al humano (<http://www.who.int/topics/cancer/es/>). En condiciones normales en cualquier organismo y después de un período de tiempo, sus células crecerán, se dividirán y duplicarán su número, para sustituir a células envejecidas o para reparar el daño producido en los tejidos, concluyendo en la muerte celular programada. Contrastante y característicamente, las células cancerosas no obedecen este patrón de desarrollo predecible como esta muy bien establecido en las células normales; éstas, crecerán, se dividirán y crearán más células anormales. Si este proceso no es revertido, paulatinamente se difunden a otras partes del cuerpo invadiendo áreas como tejidos u órganos, proceso denominado metástasis. Por tanto, se altera profundamente el crecimiento, división, diferenciación y muerte celular, generando aumento descontrolado de células que se propagan, lo que gradualmente alterará el funcionamiento normal del organismo (1). Aunque no todos los tipos de células cancerosas se difunden a las diversas partes del cuerpo, la vasta mayoría de ellas hacen metástasis, provocando consecuencias muy severas. Lo anterior ha sido señalado por la OMS y enfatiza que el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Por ejemplo, este organismo señala que a nivel mundial en el año 2021 fallecieron más de 12 millones de personas y se reportaron más de 19 millones de nuevos casos de cáncer (GLOBOCAN) <https://gco.iarc.fr/>. Es de tomar en

cuenta que, aunque esta enfermedad se presenta en todo el mundo, diversas fuentes (OMS, GLOBOCAN) indican que las muertes por cáncer se concentran en regiones con menor desarrollo económico, como África, Asia, Centroamérica y Sudamérica. En México, de acuerdo con la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), esta enfermedad es la tercera causa de muerte y cada año hay más de 128,000 nuevos casos (<http://www.uicc.org/>). En la actualidad, hay más de 32 millones de personas con cáncer en el mundo y los datos estadísticos indican que seguirá aumentando el número de personas afectadas a pesar de la gran cantidad de recursos económicos que se invierten en investigación para tratar de erradicar esta compleja enfermedad. Un ejemplo de lo anterior es que en 2018 el costo anual (tan sólo en Europa) destinado sólo a la investigación del cáncer fue estimado en más de 199 mil millones de euros (2). El cáncer, también se ha conceptualizado a menudo y de manera errónea como una enfermedad de la vejez. En este sentido, son de destacar los datos estadísticos de los Estados Unidos de Norteamérica que señalan que esta enfermedad es la segunda causa de muerte en niños con edad comprendida entre 1 a 14 años (<http://www.cdc.gov/Features/dsCancerInChildren/>). En México se estima que existen anualmente entre 5,000 y 6,000 nuevos casos de cáncer en menores de 15 años. Al respecto los tipos de cáncer más relevantes en la población infantil mexicana son las leucemias con el 52% del total de los casos; linfomas el 10% y los tumores del sistema nervioso central el 10% (http://censia.salud.gob.mx/contenidos/cancer/cancer_infantil.html). Así, el cáncer infantil es una de las principales causas de muerte por enfermedad en mexicanos entre 5 y 14 años. Por su profundo impacto en la salud, el cáncer ha sido objeto de investigaciones durante muchas décadas. Esto ha conducido a avances notables en la comprensión de las

bases moleculares y celulares que subyacen esta enfermedad; sin embargo, el desarrollo de nuevos conocimientos aún no ha logrado impactar significativamente en la disminución de nuevos casos, por lo menos en países de bajos recursos económicos. En México, los reportes indican que para el 2020 se gastaron en promedio más de 20,150 millones de pesos mexicanos, este presupuesto incluye factores médicos, no médicos, así como pérdida de la productividad principalmente de la población económicamente activa (3). Por otro lado, y dado que el cáncer es una enfermedad multifactorial y que afecta cualquier tipo celular, se han descrito más de 200 tipos de cáncer, cada uno de ellos con síntomas particulares, grados de severidad, formas de diagnóstico y tratamientos específicos. Sin embargo, a pesar de esta gran variedad, los reportes a nivel mundial mencionan que los tipos de cáncer más comunes son el cáncer de mama, pulmón, colorrectal, próstata, entre otros (Figura 1). Mientras que, para México, según GLOBOCAN los tipos de cáncer más comunes son los de mama, próstata, colorrectal, tiroides cérvico uterino, entre otros (Figura 2).

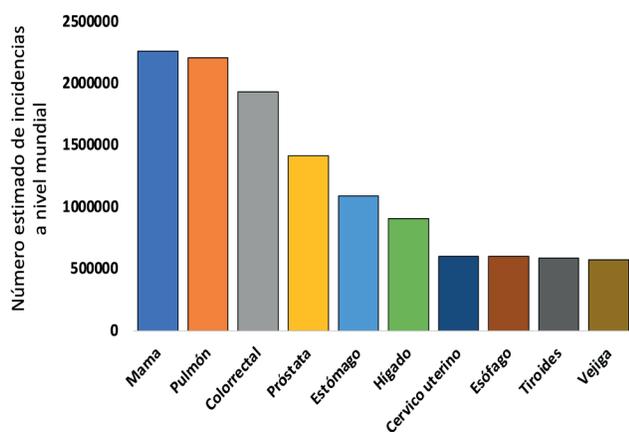


Figura 1. Los 10 tipos de cáncer más comunes y su frecuencia en ambos sexos a nivel mundial. Consultado en (<http://gco.iarc.fr/>).

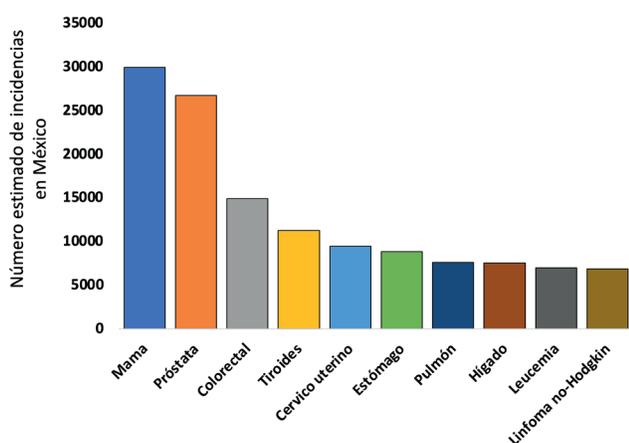


Figura 2. Los 10 tipos de cáncer más comunes y su frecuencia en ambos sexos en México. Consultado en (<http://gco.iarc.fr/>).

Los mecanismos involucrados en el inicio y desarrollo del cáncer son muy complejos y no se comprenden íntegramente. La mayoría de los tipos de cáncer se originan debido al daño en los genes o a mutaciones genéticas; en cualquier caso, puede deberse tanto a factores internos como externos (ambientales). Los factores internos pueden incluir algunos genes dentro de los cuales se han descrito dos familias que tienen gran relevancia en la génesis y difusión del cáncer. a) *Oncogenes*. Son formas mutadas de genes que promueven en las células una elevada proliferación, por lo que quedan fuera de control convirtiéndose en células cancerosas. b) *Genes supresores de tumor*. Son genes normales que regulan la división celular, ayudan a reparar errores del ácido desoxirribonucleico (ADN) y controlan la muerte celular programada o apoptosis. Cuando los genes supresores de tumor funcionan incorrectamente, las células crecen sin control conduciendo al desarrollo del cáncer. Otros factores internos importantes son los mecanismos de regulación de la expresión genética a diferentes niveles como la hipometilación global de ADN (4), alteración en la acetilación del ADN (5), alteración de modificación de histonas (6), entre otros, así como las condiciones hormonales, el estado inmunológico, los desórdenes metabólicos y las anomalías genéticas heredadas. Los factores externos o ambientales en la carcinogénesis incluyen radiación de alta energía, exposición a agentes químicos, tabaquismo, hábitos alimenticios y enfermedades infecciosas. Aunque la exposición a estos factores de riesgo no es limitante para el desarrollo de cáncer, si aumenta la predisposición.

Diagnóstico del cáncer

El diagnóstico del cáncer se hace rutinariamente con análisis microscópicos de tejidos (biopsia) o células (citología). En determinados tipos de cáncer, una autoexploración puede detectar la presencia de un posible crecimiento o tumor como en el cáncer de mama, de testículo, etc. Actualmente, se usan rutinariamente técnicas moleculares como la técnica citogenética de FISH, que identifica secuencias específicas de ADN relacionadas al cáncer. Otra técnica es la de PCR, muy cuantitativa y permite amplificar secuencias de ADN tumorales. La inmunohistoquímica se usa para detectar en tejidos tumorales, antígenos o expresión de proteínas basados en el uso de anticuerpos. La citometría de flujo es una técnica usada para examinar y diferenciar células basado en sus propiedades físicas y químicas. La microscopía electrónica se usa para identificar estructuras celulares o intracelulares que necesitan ser examinadas, lo que ayuda a una mejor clasificación del tipo de tumor. Otra forma de diagnosticar el cáncer es la detección de algunos biomarcadores que son proteínas relacionadas a esta enfermedad y cuya detección o aumento en su expresión puede confirmar la presencia de cáncer. Las pruebas de imagen ayudan en la identificación, por ejemplo: la radiología, el ultrasonido, la resonancia magnética de espectroscopía, la tomografía, la tomografía

óptica de láser, etc., son rutinariamente usadas para el diagnóstico de cáncer (7).

Tratamiento contra el cáncer

Los tratamientos que se administran a pacientes con cáncer dependen de la etapa en que se detecte, tipo de cáncer, su desarrollo y extensión. Básicamente existen cinco opciones generales de tratamiento: cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia biológica (inmunoterapia y terapia génica) y la combinación de una o más de ellas. Dado que la forma más común de tratamiento es la quimioterapia, actualmente se usan más de 100 fármacos, solos o en combinación con otros medicamentos. Muchos de estos ejercen su acción en células que se están reproduciendo activamente, sin embargo, mantienen una selectividad restringida hacia las células cancerosas, por lo que también dañan significativamente a las células normales, causando efectos secundarios muy severos tales como fatiga, pérdida de cabello, anemia, problemas gastrointestinales, desnutrición, dolor e infecciones, los cuales disminuyen considerablemente la calidad de vida de las personas e incluso pueden conducir a la muerte de los pacientes (8). Adicionalmente y para empeorar la situación ya de por sí grave, de manera frecuente, las células cancerosas pueden generar resistencia, ya sea adquirida o heredada a los diferentes tratamientos quimioterapéuticos como ha sido ampliamente demostrado (9, 10). Por tal motivo, se siguen realizando esfuerzos en investigación con el objetivo de desarrollar nuevos compuestos que sean eficaces para eliminar de manera más selectiva a las células cancerosas. Una de las estrategias de mayor éxito para lograr selectividad hacia células cancerosas, son las terapias que se basan en las diferencias metabólicas entre las células blanco (cancerosas) de las células normales.

Metabolismo de células cancerosas

Para proliferar, es necesario que las células cancerosas generen suficiente biomasa como aporte para las siguientes generaciones celulares. Por tanto, se requiere de grandes cantidades de aminoácidos, lípidos, energía en forma de ATP, nucleótidos, colesterol, etc. de tal forma que la síntesis de estas biomoléculas está alterada en los fenotipos cancerosos. Por ejemplo, se ha demostrado que el metabolismo de la glutamina está acelerado y que es importante para la producción de biomasa, debido a que es el principal donador de electrones en la síntesis anaplerótica del aspartato, que a su vez es esencial en la respiración de células en proliferación, tal y como ocurre en los procesos cancerosos (11). Otro ejemplo es el metabolismo de los lípidos, el cual también se encuentra aumentado ya que es muy efectivo para la obtención de energía mediante la β -oxidación. Esto se ha evidenciado en algunos tipos cancerosos por el incremento en la transcripción de genes relacionados con esta vía metabólica como el receptor CD36, que es quien inicia la cascada de señalización

para la internalización de lípidos del medio extracelular (12). Desde hace mucho tiempo se sabe que algunas extirpes de células cancerosas pueden ser altamente glucolíticas, por lo que tienen alta actividad metabólica y sobre-expresión de sus genes, contrastando con su contraparte células normales que tienen actividad glucolítica estrictamente regulada (13). No sólo hay aumento en el metabolismo de células cancerosas, por el contrario se han reportado deficiencias metabólicas en tumores como el hepato carcinoma, leucemias y melanoma, en las que se sabe que no expresan alguna de las enzimas necesarias para la síntesis de arginina, por lo tanto, son auxótrofas para este aminoácido; en este sentido, enzimas como la arginina deiminasa, inhiben el crecimiento de estos tumores limitando la disponibilidad extracelular de su sustrato y han sido utilizadas como terapia alternativa para combatirlos (14). Todo lo anterior establece un contraste importante entre las células normales y las cancerosas y ha sido tomado como eje en el desarrollo y búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer.

La vía glucolítica puede llegar a ser indispensable en el metabolismo energético de las células cancerosas

Desde hace muchas décadas se ha descrito el metabolismo en las células cancerosas el cual es altamente activo. En la glucólisis, una serie de eventos enzimáticos degrada la glucosa a piruvato, en este proceso se generan 2 moléculas de ATP y dos moléculas de NADH por cada molécula de glucosa. Para lograr lo anterior, en la denominada primera fase de la vía, la glucosa se fosforila, isomeriza y finalmente se degrada a dos moléculas de tres carbonos, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (GAP). En la segunda fase de la glucólisis sólo el GAP (sustrato de la enzima glucolítica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) continúa en la vía, con lo que se generan 2 moléculas de ATP y 2 moléculas de NADH. Ya que en la primera fase de la glucólisis se consumen 2 moléculas de ATP, se puede concluir que hasta este momento no existe ganancia neta de ATPs. Sin embargo, en la parte intermedia de la glucólisis, la DHAP es isomerizada por la enzima glucolítica triosafosfato isomerasa (TIM) y como consecuencia de ello se genera una molécula más de GAP que entra a la vía. Esta situación da como resultado que se sintetizan 2 moléculas de ATP adicionales. Por tanto, parte de la importancia de la TIM en la glucólisis radica en el aporte extra de sustratos glucolíticos, lo que conduce a la producción neta global de 2 moléculas de ATP aprovechables para la célula, por cada molécula de glucosa metabolizada. Esto es de vital importancia para una gran variedad de células cancerosas, ya que dependen en gran medida de la glucólisis y en condiciones aeróbicas dicha vía energética puede proveer hasta el 60 % del ATP que demanda la célula tumoral (15) comparado con sólo el 10 % en células normales; Warburg atribuyó este efecto a la fosforilación oxidativa mitocondrial defectuosa en células cancerosas (16).

Estudios posteriores con células cancerosas, han demostrado que pueden existir una o más de las siguientes condiciones: función mitocondrial defectuosa, disminución en la expresión de enzimas oxidativas y transportadores mitocondriales, así como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos truncado, menor cantidad de mitocondrias por célula, cadena respiratoria defectuosa, aumento en la cantidad de inhibidores naturales de la ATP sintasa mitocondrial y una alta sensibilidad del ADN mitocondrial al estrés oxidativo (17). No obstante, otros autores han contribuido con evidencia relevante que deja ver que este fenómeno es aún más complejo, lo que no invalida el argumento de Warburg. Por otro lado, se ha demostrado en las células cancerosas que la glucólisis no sólo es importante para la generación de ATP, también es una fuente importante de intermediarios metabólicos para la síntesis rápida de aminoácidos, nucleósidos y lípidos. Se han cuantificado altos niveles de glucólisis aeróbica en una amplia gama de tumores, independientemente del tipo de tejido del cual se originaron, en contraste con tejidos normales que no utilizan la glucólisis aeróbica para satisfacer su demanda energética y de metabolitos (18). Esto indica que una característica de las células cancerosas, en combinación con el crecimiento sin restricciones, es la de desarrollar un fenotipo glucolítico acelerado que proporciona ventajas proliferativas a las células que se dividen rápidamente. Por lo tanto, la vía glucolítica se puede considerar como blanco atractivo y selectivo para el desarrollo de compuestos anticancerígenos. Esta situación ha sido previamente aprovechada por algunos investigadores y en la actualidad se conocen distintos trabajos donde se evalúan las enzimas de esta vía como potenciales blancos. En consecuencia, el desarrollo de inhibidores de estas enzimas con efecto anti-cancerígeno, se ha centrado en el uso de análogos de sustrato (19, 20). Sin embargo, lo anterior ha tenido poco éxito ya que se ha demostrado que son altamente tóxicos en modelos experimentales, puesto que se evalúan compuestos con gran afinidad hacia los sitios activos de estas enzimas y estas zonas son estrictamente conservadas entre enzimas aún de diferentes especies. Por lo que el estudio y comprensión de las diferencias bioquímicas (funcionales y estructurales) entre las enzimas glucolíticas de las células normales y las cancerosas es esencial para el diseño y desarrollo de nuevos compuestos anticancerígenos con mayor selectividad. Con fundamento en las premisas anteriores, hemos caracterizado a la enzima glucolítica triosafosfato isomerasa de humano (HsTIM) y demostramos que existen notables diferencias tanto a nivel funcional como estructural en condiciones de desamidación, que es una modificación post-traducciona no enzimática que se desarrolla espontáneamente cuando la HsTIM tiene intensa actividad catalítica (21).

La triosafosfato isomerasa es una enzima fundamental

Dentro de los aspectos relevantes de la TIM destaca la interconversión entre la DHAP y el GAP ya que como se

mencionó anteriormente, en el balance final de la glucólisis se genera ganancia neta de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada. Otra relevancia no menos importante de esta enzima glucolítica es que evita la acumulación del sustrato DHAP, molécula que puede degradarse espontáneamente a metilglioxal, el cual es un compuesto altamente tóxico y reactivo para la célula ya que genera daño tanto al ADN, proteínas y lípidos, uniéndose covalentemente a estas biomoléculas (22). Se ha demostrado que, si la TIM está ausente o inactiva, da como resultado el consumo de glucosa sin ganancia de ATP, así como la acumulación de DHAP, lo que genera altas concentraciones de metilglioxal dañando significativamente la integridad celular (23). En consecuencia, en células donde la glucólisis es importante como fuente de energía y metabolitos, esta condición podría amenazar seriamente la supervivencia de dichas células. Por tanto y con base en los argumentos anteriores, la TIM puede considerarse como un blanco atractivo para el diseño de moléculas anticancerígenas.

La TIM es una enzima que ha sido exhaustivamente estudiada y propuesta como blanco terapéutico

La TIM ha sido ampliamente estudiada en una gran variedad de especies tanto a nivel funcional como estructural, se considera como un catalizador perfecto ya que se ha estimado que su catálisis se encuentra limitada sólo por la difusión de sus sustratos (24). Se conoce la secuencia de la TIM en más de 4900 especies (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), así como la estructura cristalográfica de más de 90 especies de enzimas silvestres y sus mutantes, solas o en complejo con distintos ligandos, inhibidores u otras moléculas, la base de datos Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) reporta más de 905 estructuras cristalográficas referentes a la TIM. Todo lo anterior proporciona ventajas para el estudio de su entendimiento en condiciones normales y anómalas. Cada subunidad o monómero de esta enzima lo conforman ocho hojas- β plegadas centrales, rodeadas por ocho hélices- α , las cuales se conectan a través de asas, patrón de plegamiento conocido como dominio barril α/β o barril TIM. El sitio catalítico se localiza en la parte central del barril, formado por tres aminoácidos: la Lisina (Lys) 14, la Histidina (His) 96 y el Ácido Glutámico (Glu) 166 (Figura 3), esta numeración corresponde a la secuencia aminoácil de la TIM de humano (HsTIM). Biológicamente, la TIM se asocia como dímero y cada monómero tiene un sitio catalítico independiente, a pesar de ello, el monómero aislado no es activo, por lo que se requiere de la dimerización para lograr que la enzima sea catalíticamente activa. Lo anterior implica que la interfaz o sitio de contacto entre las dos subunidades, es indispensable para su funcionalidad.

La HsTIM ha sido caracterizada tanto a nivel funcional como estructural, en un trabajo reciente se propuso como potencial blanco anticancerígeno (25). En el citado trabajo

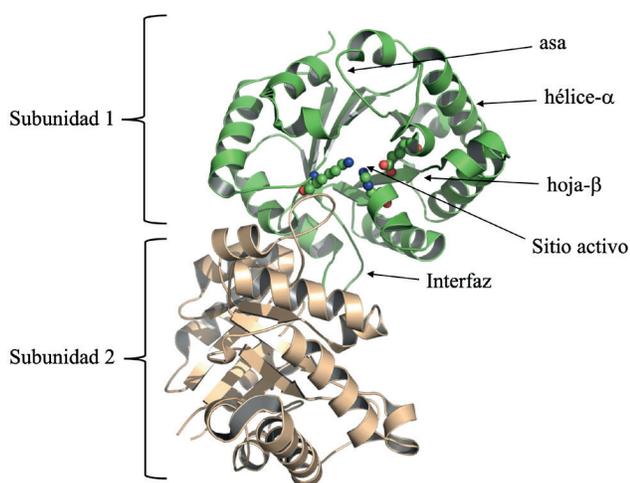


Figura 3. Estructura secundaria en formato de asas y listones de la estructura cristalográfica de la triosafosfato isomerasa de humano (HsTIM), código PDB 2jk2. Se muestra la unidad biológica que es el dímero (verde y café) de la enzima, así como la estructura secundaria, interfaz (sitio de contacto entre dos subunidades) y la posición de los aminoácidos que constituyen el sitio activo en una de sus subunidades. Figura modelada con PyMOL, version 2.0.7 (Schrödinger Inc, NY, USA).

se realizaron estudios de acoplamiento molecular (*docking*) identificando algunas moléculas potenciales que se proponen como inhibidores de esta enzima. A pesar de la excelente contribución de este trabajo, los autores sólo generaron hipótesis que no han sido corroboradas y no definieron como obtener moléculas inhibitorias que tengan selectividad sobre la TIM de células cancerosas sin que interfiera con la actividad de la TIM de células normales. En ese sentido desde hace algún tiempo hemos caracterizado la desamidación de la HsTIM, condición que la hace funcional y estructuralmente diferente a la enzima no desamidada.

La desamidación de la triosafosfato isomerasa de humano genera alteraciones estructurales que se pueden aprovechar para el diseño racional de fármacos

La HsTIM ha sido caracterizada extensivamente desde hace más de 30 años, particularmente ha llamado la atención un evento postraduccional conocido como desamidación. La desamidación es una reacción química que remueve el grupo funcional amida de un compuesto orgánico de manera irreversible. En las proteínas, esta reacción puede ocurrir *in vitro* o *in vivo*, llevándose a cabo tanto en los residuos aminoáciles de asparagina (Asn) como glutamina (Gln), los cuales son convertidos a ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu), respectivamente (26). Esta modificación implica la introducción de una carga negativa donde antes no la había, lo que puede alterar progresivamente la actividad biológica e integridad estructural de las proteínas. De acuerdo con diversos investigadores conduce a la proteólisis para su eliminación, es decir, se considera como una “señal” que daría lugar a su recambio proteico controlado, lo anterior,

sin embargo, hasta la fecha no ha sido convincentemente demostrado. Por otro lado, la desamidación es un evento no enzimático y que se lleva a cabo de manera espontánea, aunque a diferentes tasas de velocidad, dependiendo de cada enzima. Es importante señalar que en pocas proteínas incluyendo la TIM se ha demostrado que esta reacción se acelera con los ciclos catalíticos (27). Además, se sabe que este fenómeno se presenta de manera natural en la HsTIM. Por tanto, la excesiva y continua actividad glucolítica en las células cancerosas puede implicar un alto número de ciclos catalíticos de la TIM, lo que potencialmente conduciría a que haya abundancia de la enzima desamidada. En este mismo orden de ideas, esto contrastaría con las células normales, donde la glucólisis es estrictamente regulada. A ese respecto, existen estudios donde se demuestra que en células con actividad proliferante hay formas de HsTIM desamidada (28). Particularmente en esta enzima el residuo de aminoácido Asn 16 es muy importante en el proceso de desamidación y desestabilización estructural, este se encuentra estrechamente relacionado con el sitio catalítico y la interfaz en una posición de gran accesibilidad al solvente. También se ha documentado la desamidación de la Asn 72, sin embargo, parece no contribuir en la inestabilidad general de la enzima, producto de dicha desmidación. En un trabajo del 2015 (21) caracterizamos *in vitro* esta enzima y demostramos que mimetizando el evento postraduccional de desamidación (por mutagénesis sitio dirigida mediante la técnica de la PCR, sustituyendo Asn por Glu) en la posición 16 (N16D), se promueve una notable afectación estructural cuando se compara con la enzima no desamidada (Figura 4).

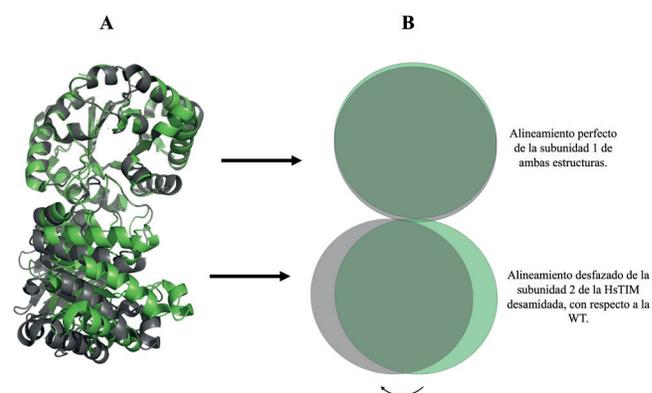


Figura 4. Superposición estructural del dímero de la HsTIM, no desamidada (WT) y desamidada (N16D). A) Representación de la estructura cristalográfica en formato de asas y listones. Se muestra la superposición de la HsTIM silvestre (WT), código PDB 2jk2 (verde) vs la HsTIM N16D, código PDB 4unk (gris). En ambas estructuras una de las subunidades alinea correctamente, mientras que la otra se desplaza en promedio 5.8 Å, con respecto a la WT. B) Representación sencilla de la superposición mostrada en (A), este esquema permite destacar el desplazamiento de una de las subunidades de HsTIM N16D debido a la desamidación. Figura modelada con PyMOL, version 2.0.7 (Schrödinger Inc, NY, USA).

La figura 4 muestra la superposición estructural de la HsTIM silvestre (WT) vs la HsTIM desamidada (N16D). Este análisis demuestra que una de las subunidades del dímero en la enzima desamidada, al superponerse con la enzima no desamidada, se desplaza en promedio 5.8 Å. Revisando con más detalle la estructura cristalográfica de la HsTIM desamidada, se identificó que en la interfaz del dímero se pierden aproximadamente el 60 % de sus interacciones, por lo que se genera una gran porosidad en esa zona. En consecuencia y debido a la afectación estructural, la HsTIM desamidada es altamente permeable a moléculas de bajo peso molecular a diferencia de la enzima no desamidada que es poco permeable a estas moléculas, siendo esto demostrado tanto por métodos computacionales como el *docking* molecular (Figura 5), así como experimentalmente.

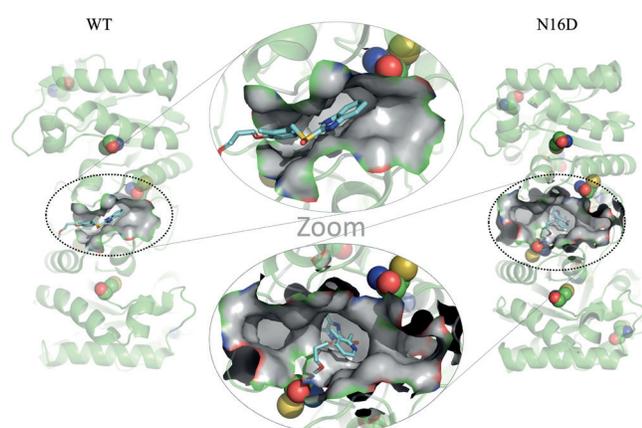


Figura 5. Estructuras cristalográficas de la HsTIM [código PDB: 2jk2 (WT) y 4unk (N16D)] en formato de asas y listones. Se muestra la cavidad principal en la interfaz (sitio de contacto entre dos subunidades) y como se acopla la molécula del rabeprazol. Hacia el centro de la imagen se observa el detalle del acoplamiento molecular en ambas proteínas. Figura modelada con PyMOL, version 2.0.7 (Schrödinger Inc, NY, USA).

Debido a este conjunto de propiedades muy características de la enzima desamidada que no las presenta la enzima WT, decidimos evaluar si era posible inhibirla selectivamente. En un trabajo reciente demostramos que, la enzima recombinante HsTIM N16D (desamidada) fue inhibida en su actividad enzimática con el fármaco tiol reactivo omeprazol, mientras que la enzima recombinante HsTIM WT, mantuvo su actividad enzimática sin afectarse en ausencia y presencia del mencionado fármaco. Fuimos incluso más allá del modelo recombinante y utilizamos un sistema bacteriano carente de la TIM endógena, donde se complementó con la HsTIM WT o HsTIM desamidada (N16D). En dicho modelo bacteriano demostramos que es posible inhibir el crecimiento celular en bacterias que portan el gen *hstim n16d*, si se exponen al fármaco omeprazol, mientras que las bacterias que portan el gen *hstim wt*, mantienen estable su crecimiento en presencia de dicho fármaco (29). Estos hallazgos nos demostraron diferencias significativas en sensibilidad a este tipo de

fármacos entre las enzimas WT y N16D y que además es posible reproducir dicha sensibilidad en un modelo celular. A pesar de estos novedosos hallazgos, nuestro objetivo fue muy claro desde un principio, debíamos demostrar que esta enzima desamidada está presente y acumulada en células con alta dependencia de la glucólisis y que es susceptible de inhibirse con los mencionados fármacos, y que además en células normales la enzima desamidada estaría escasamente representada, presumiblemente debido al recambio proteico. Para tal propósito utilizamos células de cáncer de mama MDA-MB-231 ya que son altamente glucolíticas. En nuestros resultados más importantes demostramos que la proliferación de células de cáncer de mama se inhibe eficientemente en presencia de los fármacos tiol reactivos rabeprazol y auranofina. Interesantemente encontramos que también se inhibe la actividad enzimática de la TIM celular. Por el contrario, al exponer células normales HMEC (de epitelio mamario) con los fármacos antes citados, no se registró inhibición en la proliferación celular, ni pérdida de la actividad enzimática de la TIM (30). Experimentos posteriores nos permitieron identificar la presencia de la enzima desamidada en las células cancerosas, y su notable poca presencia en células normales (Figura 6). Es importante mencionar que para tal propósito utilizamos el método de hidrólisis proteica por hidroxilamina, que identifica la presencia o ausencia de desamidación en muestras proteicas, generando diversos fragmentos peptídicos que pueden ser identificados por su perfil de hidrólisis en geles desnaturizantes SDS-PAGE. La Figura 6 muestra uno de los experimentos de nuestro Laboratorio donde demostramos el perfil de hidrólisis de las HsTIMs.

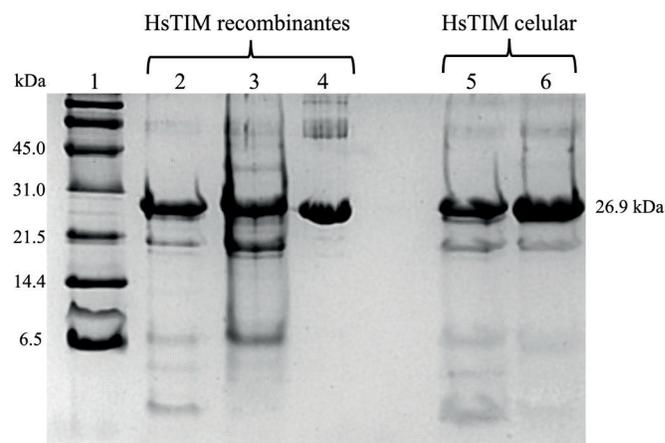


Figura 6. Identificación de HsTIM desamidada en células de cáncer de mama. SDS-PAGE al 16 % de la hidrólisis por hidroxilamina de las HsTIM recombinantes y TIM proveniente de células: Carril 1: estándar de peso molecular, carriles 2 a 4: (10 µg de proteína/carril) HsTIMs no desamidada (WT), una vez desamidada (N16D) y dos veces desamidada (N16D/N72D), carriles 5 y 6: (20 µg de proteína/carril) HsTIM inmunoprecipitada de células normales y cancerosas, respectivamente.

De acuerdo con la Figura 6 se demuestra que en los carriles 2, 3 y 4 hubo diferentes grados de hidrólisis de las enzimas recombinantes HsTIM WT (no desamidada), HsTIM N16D (desamidada) y HsTIM N16D/N72D (doblemente desamidada), esto es, las enzimas recombinantes funcionaron como referencia para verificar la presencia o ausencia de la TIM desamidada en células normales y cancerosas. En los carriles 5 y 6 se muestra el perfil de hidrólisis de TIM extraída (inmunoprecipitada) de células normales (HMEC) y células cancerosas (MDA-MB-231), respectivamente. Es evidente que la TIM de células normales (carril 5) presentó un perfil de hidrólisis similar al de la HsTIM no desamidada (carril 2); mientras que la TIM de células cancerosas (carril 6) presentó un perfil de hidrólisis similar al de la HsTIM

desamidada (carril 3). Por tanto, estos experimentos nos demuestran la presencia de la enzima desamidada en las células cancerosas, tal como lo suponíamos. Sin embargo y para reforzar los hallazgos anteriores, realizamos otros ensayos con geles nativos en los cuales se puede evidenciar la presencia de isoformas con carga negativa (como las que se generan cuando se desamida la HsTIM). En este ensayo también fue necesario emplear las enzimas recombinantes como referencia de migración, así como extractos totales de proteína de células cancerosas y normales, en ausencia y presencia de rabeprazol. Al revelar por Western-blot la señal de la HsTIM, demostramos la presencia de isoformas ácidas en células de cáncer de mama, mientras que en células normales no se observaron dichas isoformas (Figura 7).

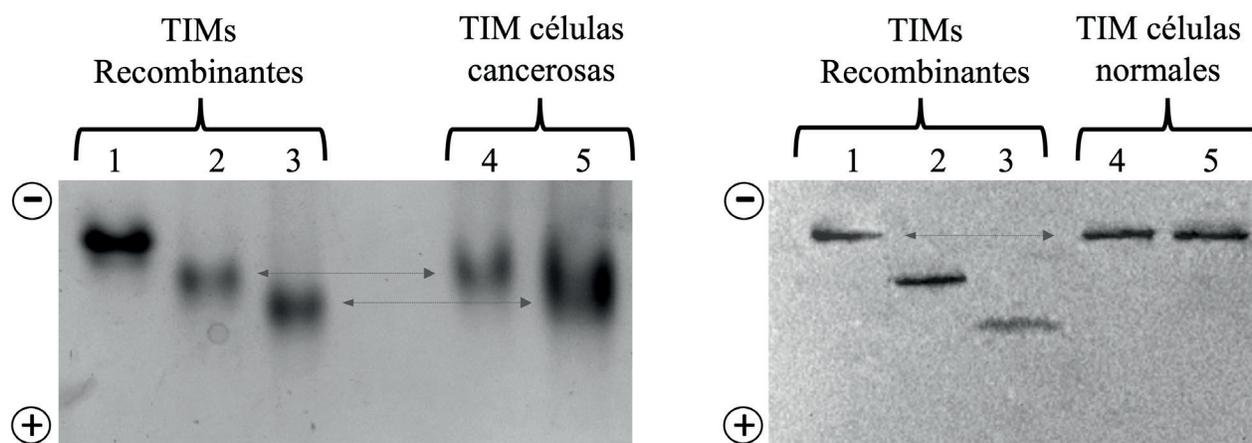


Figura 7. Western-blot de HsTIM recombinantes y celular en geles nativos. Carriles 1 a 3 (2 µg de proteína/carril), HsTIM recombinante no desamidada, una vez desamidada y dos veces desamidada, respectivamente. Carriles 4 y 5 (100 µg de extracto proteína/carril), extracto proteico de células cancerosas (gel de la izquierda) y células normales (gel de la derecha). Carriles 4: controles, carriles 5 tratamiento con rabeprazol. La flecha indica el nivel que migró la TIM de células cancerosas y normales, respecto a las proteínas de referencia (recombinantes). La polaridad de los geles se indica en la parte izquierda de cada figura.

En la Figura 7 se observa tanto la presencia de isoformas ácidas (con carga negativa), así como la acumulación de la HsTIM desamidada en células de cáncer de mama, contrastante e interesantemente en las células normales no se observó la presencia de tales isoformas ácidas. Adicionalmente el tratamiento con el fármaco tiol reactivo rabeprazol indujo mayor acumulación de dichas isoformas que ya estaban previamente presentes en la línea celular cancerosa (Figura 7, carriles 5 y 4 respectivamente en células cancerosas). En resumen, la inactivación selectiva de la HsTIM en células cancerosas, con la correspondiente muerte celular en presencia del fármaco tiol reactivo, así como la presencia y acumulación de la HsTIM desamidada mayoritariamente en células de cáncer de mama, nos ha permitido identificar un blanco molecular diferenciable que está presente en células cancerosas y que es sensible a fármacos tiol reactivos, es un paso significativo en la búsqueda de alternativas anticancerígenas con gran selectividad.

Otras modificaciones postraduccionales de la HsTIM que alteran su estructura y pueden ser consideradas con potencial anticancerígeno

Se ha descrito que las modificaciones postraduccionales pueden alterar las propiedades funcionales y estructurales de las proteínas, incluida la HsTIM. En ese sentido se sabe que en esta enzima se pueden llevar a cabo algunas modificaciones postraduccionales, mismas que potencialmente pueden afectar su estructura, lo que podría aprovecharse para el desarrollo de compuestos con potencial anticancerígeno. Así, otra modificación postraduccionales que se ha identificado en la HsTIM es la fosforilación, esta implica la adición de un grupo fosfato a residuos aminoácidos como la serina (Ser), treonina (Thr) o tirosina (Tyr), mediante enzimas llamadas quinasas y puede ocurrir en respuesta a diversas señales celulares. En consecuencia, la fosforilación puede provocar cambios conformacionales, alterando su forma original y creando nuevos sitios de unión para moléculas pequeñas. Por

ejemplo, la fosforilación de la HsTIM se ha observado en respuesta a diversos estímulos, como el estrés, los factores de crecimiento, etc. Además, se ha demostrado que puede modular la actividad de esta enzima y hasta su localización sub-celular. Existen diversas publicaciones que demuestran que la HsTIM se fosforila en diversos sitios provocando, ya sea la disminución de su actividad enzimática como fue demostrado en células cancerosas HeLa (31) o bien el aumento de su actividad enzimática producto de dicha fosforilación (32, 33). Duan y colaboradores en el 2020 encontraron que la HsTIM se fosforila en la Serina 21 (aunque en su artículo hacen referencia a este mismo residuo aminoácido como Serina 58, ya que se basan en la isoforma 2) e identifican que debido a esto aumentan significativamente tanto la producción como la actividad de esta enzima en algunos tipos de tumores. Demuestran además que al bloquear su fosforilación se inhibe parcialmente la glucólisis, el crecimiento de células cancerosas y la correspondiente metástasis, por lo que potencialmente esta modificación postraduccional puede usarse como modelo molecular para evidenciar cambios estructurales que nos permitan identificar diferencias con respecto a la enzima no fosforilada, como lo demostramos para el caso de la desamidación. Como se muestra en la Figura 8, este tipo de fosforilaciones podrían provocar alteraciones estructurales en la enzima. La figura muestra una simulación *in silico* de dos fosforilaciones importantes en la HsTIM y pone en evidencia que después de la fosforilación se generan contactos no permitidos en esta zona, que potencialmente conducirían a alteraciones estructurales sustanciales haciendo permeable a la enzima a moléculas pequeñas que puedan interferir con su función.

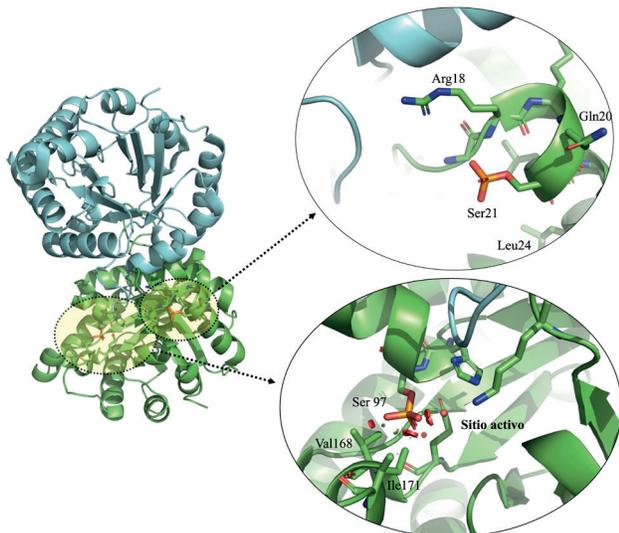


Figura 8. Estructura cristalográfica de la HsTIM [código PDB: 2jk2 en formato de asas y listones]. Se muestran las dos subunidades del dímero en colores cian y verde. En uno de los monómeros se observan las Serinas 21 y 97 fosforiladas (sobreadas en amarillo transparente). Del lado derecho de la figura se muestra un aumento de dichas zonas que destacan la fosforilación. Las fosforilaciones y la estructura fueron preparadas y modeladas con PyMOL, versión 2.0.7 (Schrödinger Inc, NY, USA).

Para el caso de la fosforilación en la Serina 21 ya ha sido demostrado experimentalmente que la HsTIM aumenta su actividad enzimática formando complejos heterodiméricos, lo que ayuda a que la glucólisis genere más ATP (33). Debido a lo anterior y en el contexto del diseño de moléculas con potencial anticancerígeno, la estructura alterada de la HsTIM fosforilada, podría explotarse como un objetivo farmacológico. Las células cancerosas pueden presentar vías de señalización anormales que impliquen fosforilaciones aberrantes de proteínas específicas como la HsTIM. Así, mediante el diseño de compuestos que se dirijan selectivamente a estos sitios alterados, producto de la fosforilación, sería posible inhibir la actividad de la HsTIM, lo que puede evitar la proliferación celular y con esto prevenir el crecimiento y propagación de las células cancerosas. Además, esta enzima podría no estar fosforilada (o en menor grado) en las células normales. Por lo que este fenómeno presenta una oportunidad para desarrollar compuestos que se dirijan específicamente a este tipo de proteínas sin afectar las células sanas. Por otro lado, otra modificación postraduccional relevante que ha sido identificada y estudiada en la HsTIM es la S-nitrosilación, esta implica la unión covalente de un grupo funcional de óxido nítrico a un residuo de cisteína en una proteína. Por ejemplo, en una investigación se demostró que la S-nitrosilación, puede regular la actividad de la HsTIM y esto ha sido implicado en el desarrollo y progresión del cáncer. Se ha demostrado que esta modificación puede modular la actividad y la estabilidad de la enzima. El estudio en cuestión demostró que la S-nitrosilación disminuye su actividad enzimática (34). Adicionalmente se determinó la estructura cristalográfica de esta enzima donde se logró identificar que la cisteína 217 estaba S-nitrosilada (Figura 9).

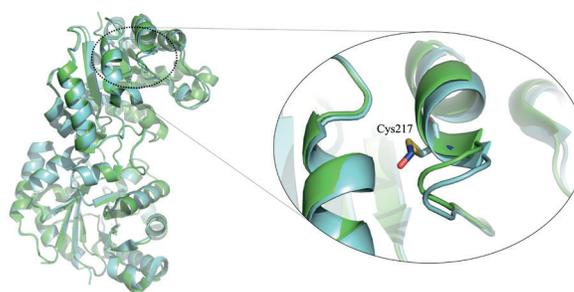


Figura 9. Estructuras cristalográficas de la HsTIM WT [código PDB: 2jk2] y la HsTIM S-nitrosilada [código PDB: 6d43] en formato de asas y listones. Se muestran las dos subunidades del dímero en colores cian y verde. Se muestra la superposición estructural del dímero de las mencionadas enzimas: verde WT y cian S-nitrosilada. Del lado derecho de la figura se muestra un aumento de la zona de la Cisteína 217 S-nitrosilada, este aumento permite identificar una ligera alteración estructural promovida por la modificación postraduccional. Figura modelada con PyMOL, versión 2.0.7 (Schrödinger Inc, NY, USA).

Como se observa en la Figura anterior, la evidente alteración estructural promovida por otra modificación postraduccional nos da la pauta para considerar a esta enzima en el citado desarrollo de compuestos con potencial anticancerígeno. Adicionalmente en un entorno alterado como el de las células cancerosas podría acumularse este tipo de enzimas como ha sido demostrado para la S-nitrosilación de la HsTIM donde se evidenció que se afectó su estabilidad, ya que es más resistente a su degradación (35). Esta mayor estabilidad podría contribuir a una acumulación de la HsTIM en las células cancerosas, promoviendo la supervivencia y proliferación de las células cancerosas. Hay gran cantidad de estudios donde se ha demostrado que esta enzima glucolítica se encuentra S-nitrosilada, por ejemplo, se encontró en adenocarcinoma ductal pancreático humano (36). Finalmente como hemos visto, estos eventos postraduccionales en la HsTIM como la desamidación, la fosforilación y la S-nitrosilación pueden alterar la estructura y la función de esta enzima que es clave en la vía glucolítica. Por lo que estos cambios sutiles en la estructura de la HsTIM resultantes de estas modificaciones pueden aprovecharse para el desarrollo de nuevas moléculas

con potencial anticancerígeno. Si consideramos lo anterior sumado a que la enzima está sobre-regulada en muchos tipos de células cancerosas, habrá grandes posibilidades de encontrar diferencias con respecto a las células normales, que puedan usarse para el desarrollo de nuevas moléculas con potencial anticancerígeno. Sin embargo, esto no está limitado a la HsTIM, una gran cantidad de proteínas con alteración estructural debido a las modificaciones postraduccionales, se perfila como un ejército de nuevas oportunidades para contar con mejores herramientas en la lucha contra el cáncer. Aquellas proteínas que cumplan con los requisitos presentados para la HsTIM podrían ser consideradas para tal propósito.

Agradecimientos.

Esta revisión ha estado financiada por el Programa Recursos Fiscales para la Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, números 2019/072 (E.-F., S.), 2019/062 (L.-V., G.) y 2020/016 (F.-L., L. A.). Ciencia de Frontera 2023, CONAHCYT CF-2023-1-811.

Referencias

- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**, 646–674.
- Hofmarcher, T., Lindgren, P., Wilking, N., and Jönsson, B. (2020). The cost of cancer in Europe 2018. *European journal of cancer*. **129**, 41–49.
- Gutiérrez-Delgado, C., Armas-Texta, D., Reynoso-Noverón, N., Meneses-García, A., and Mohar-Betancourt, A. (2016). Estimating the indirect costs associated with the expected number of cancer cases in Mexico by 2020. *Salud publica de Mexico*. **58**, 228–236.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. **301**, 89–92.
- Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., and Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets?. *Cancer letters*. **277**, 8–21.
- Santos-Rosa, H., and Caldas, C. (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *European journal of cancer*. **41**, 2381–2402.
- Perfors, I., May, A., Boeijen J., de Wit N., van der Wall E., Helsen C. (2019). Involving the general practitioner during curative cancer treatment: a systematic review of health care interventions. *BMJ Open*. **9**, e026383.
- Altun, İ., Sonkaya, A. (2018). The Most Common Side Effects Experienced by Patients Were Receiving First Cycle of Chemotherapy. *Iran J Public Health*. **47**, 1218-1219.
- Liu, Y., Li, Q., Zhou, L., Xie, N., Nice, E., Zhang, H., Huang, C., and Lei, Y. (2016). Cancer drug resistance: redox resetting renders a way. *Oncotarget*. **7**, 42740–42761.
- Zhao, X., and Subramanian, S. (2017). Intrinsic resistance of solid tumors to immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Res*. **77**, 817–22.
- Sullivan, L., Gui, D., Hosios, A., Bush, L., Freinkman, E., Vander, M. (2015). Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. *Cell*. **162**, 552–63.
- Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J., Bescós, C., Di Croce, L., Benitah S. (2017). Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*. **5**, 41-45.
- Soga T. (2013). Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci*. **104**, 275–81.
- Ni, Y., Schwaneberg, U., Sun, Z. (2008). Arginine deiminase, a potential anti-tumor drug. *Cancer Lett*. **8**, 1-11.
- Busk, M., Horsman, M., Kristjansen, P., van der Kogel, A., Bussink, J., Overgaard, J. (2008). Aerobic glycolysis in cancers: implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia. *Int J Cancer*. **122**, 2726-34.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*. **123**, 309-14.
- Chang, G., Liu, K., Hsieh, C., Hu, T., Charoenfuprasert, S., Liu, H., Luh, K., Hsu, L., Wu, C., Ting, C., Chen, C., Chen, K., Yang, T., Chou, T., Wang, W., Whang-Peng, J., and Shih, N. (2006). Identification of alpha-enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. *Clinical cancer research*. **12**, 5746–5754.
- Vander Heiden, M., Cantley, L., and Thompson, C. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. **324**, 1029–1033.
- Pelicano, H., Martin, D., Xu, R., and Huang, P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. **25**, 4633–4646.
- Ganapathy-Kanniappan, S., and Geschwind, J. (2013). Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Molecular cancer*. **12**, 152.
- De la Mora-de la Mora, I., Torres-Larios, A., Enríquez-Flores, S., Méndez, S., Castillo-Villanueva, A., Gómez-Manzo, S., López-Velázquez, G., Marcial-Quino, J., Torres-Arroyo, A., García-Torres, I., Reyes-Vivas, H., and Oria-Hernández, J. (2015). Structural effects of protein aging: terminal marking by deamidation in human triosephosphate isomerase. *PLoS one*. **10**, e0123379.
- Ahmed, N., Battah, S., Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Horányi, M., Baróti, K., Hollan, S., and Thornalley, P. (2003). Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochimica et biophysica acta*. **1639**, 121–132.
- Aissa, K., Kamoun, F., Sfaihi, L., Ghedira, E. S., Aloulou, H., Kamoun, T., Pissard, S., and Hachicha, M. (2014). Hemolytic anemia and progressive neurologic impairment: think about triosephosphate isomerase deficiency. *Fetal and pediatric pathology*. **33**, 234–238.
- Stroppolo, M., Falconi, M., Caccuri, A., and Desideri, A. (2001). Superefficient enzymes. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. **58**, 1451–1460.

25. Marsh, L., and Shah, K. (2014). A novel inhibitor of Mammalian triosephosphate isomerase found by an in silico approach. *International journal of medicinal chemistry*. **2014**, 469125.
26. Hao, P., Adav, S., Gallart-Palau, X., and Sze, S. (2017). Recent advances in mass spectrometric analysis of protein deamidation. *Mass spectrometry reviews*. **36**, 677–692.
27. Robinson, N., and Robinson, A. (2008). Use of Merrifield solid phase peptide synthesis in investigations of biological deamidation of peptides and proteins. *Biopolymers*. **90**, 297–306.
28. Decker, R., and Mohrenweiser, H. (1985). Cell proliferation-associated expression of a recently evolved isozyme of triosephosphate isomerase. *Biochemical genetics*. **23**, 267–280.
29. Enríquez-Flores, S., Flores-López, L. A., García-Torres, I., de la Mora-de la Mora, I., Cabrera, N., Gutiérrez-Castrellón, P., Martínez-Pérez, Y., and López-Velázquez, G. (2020). Deamidated Human Triosephosphate Isomerase is a Promising Druggable Target. *Biomolecules*. **10**, 1050.
30. Enríquez-Flores, S., Flores-López, L. A., De la Mora-De la Mora, I., García-Torres, I., Gracia-Mora, I., Gutiérrez-Castrellón, P., Fernández-Lainez, C., Martínez-Pérez, Y., Olaya-Vargas, A., de Vos, P., and López-Velázquez, G. (2022). Naturally occurring deamidated triosephosphate isomerase is a promising target for cell-selective therapy in cancer. *Scientific reports*. **12**, 4028.
31. Lee, W. H., Choi, J., Byun, M., Koo, K., Shin, S., Lee, S., and Surh, Y. (2010). Functional inactivation of triosephosphate isomerase through phosphorylation during etoposide-induced apoptosis in HeLa cells: potential role of Cdk2. *Toxicology*. **278**, 224–228.
32. Duan, Y., Li, J., Wang, F., Wei, J., Yang, Z., Sun, M., Liu, J., Wen, M., Huang, W., Chen, Z., Lu, Z., Yang, J., and Wei, G. (2021). Protein modifications throughout the lung cancer proteome unravel the cancer-specific regulation of glycolysis. *Cell reports*. **37**, 110137.
33. Schachner, L., Soye, B., Ro, S., Kenney, G., Ives, A., Su, T., Goo, Y., Jewett, M., Rosenzweig, A., and Kelleher, N. (2022). Revving an Engine of Human Metabolism: Activity Enhancement of Triosephosphate Isomerase via Hemi-Phosphorylation. *ACS chemical biology*. **17**, 2769–2780.
34. Romero, J., Carrizo, M., and Curtino, J. (2018). Characterization of human triosephosphate isomerase S-nitrosylation. *Nitric oxide : biology and chemistry*. **77**, 26–34.
35. Tajés, M., Eraso-Pichot, A., Rubio-Moscardó, F., Guivernau, B., Ramos-Fernández, E., Bosch-Morató, M., Guix, F., Clarimón, J., Miscione, G., Boada, M., Gil-Gómez, G., Suzuki, T., Molina, H., Villà-Freixa, J., Vicente, R., and Muñoz, F. J. (2014). Methylglyoxal produced by amyloid- β peptide-induced nitrotyrosination of triosephosphate isomerase triggers neuronal death in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. **41**, 273–288.
36. Tan, C., Li, Y., Huang, X., Wei, M., Huang, Y., Tang, Z., Huang, H., Zhou, W., Wang, Y., and Hu, J. (2019). Extensive protein S-nitrosylation associated with human pancreatic ductal adenocarcinoma pathogenesis. *Cell death & disease*. **10**, 914.



DR. SERGIO ENRÍQUEZ FLORES
ORCID: 0000-0003-2058-5707.

Egresado de la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realizó estudios de Maestría y Doctorado en el Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM. Actualmente es investigador en Ciencias Médicas, adscrito al laboratorio de Biomoléculas y Salud Infantil, en el quinto piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel I. Ha contribuido en la formación de alumnos como profesor de asignatura de Biología Molecular de la Célula I y Biotecnología I de la Facultad de Ciencias de la UNAM, así como profesor en el Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. Cuenta con 42 artículos en revistas de arbitraje e indizadas y cuatro capítulos de libro. Ha participado en 40 trabajos orales y en formato de póster en congresos nacionales e internacionales. Ha estudiado enzimas de diferentes parásitos, como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, así como del humano. Su principal línea de investigación se centra en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial anticancerígeno tomando como modelo las modificaciones postraduccionales que se presentan en la triosafosfato isomerasa de humano.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 47-57

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Fronteras en el diseño de proteínas.

Frontiers in protein design.

Fernández Velasco, D. Alejandro ^{1*}, Hurtado Bautista, Enrique ¹ y Segovia, Lorenzo ²

¹Laboratorio de Fisiología e Ingeniería de Proteínas. Departamento de Bioquímica.
Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

²Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología.
Universidad Nacional Autónoma de México.

*Correspondencia: Laboratorio de Fisiología e Ingeniería de Proteínas. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNAM, Avenida Universidad 3000 Circuito Exterior S/N, Col. Ciudad Universitaria, Coyoacán. CDMX (México), C.P. 04510 Tel. +52 (55)5623-2259, fdaniel@unam.mx

Resumen

El diseño de proteínas es el proceso en el cual estas moléculas son modificadas para que tengan una estructura y función específicas. Esto implica utilizar técnicas de biología molecular, bioinformática y química para diseñar proteínas con nuevas propiedades, como mayor estabilidad, actividad enzimática mejorada o afinidad por una molécula específica. Para ello, existen tres aproximaciones complementarias: El enfoque racional se basa en la comprensión de la estructura y la función de las proteínas existentes para predecir cómo un cambio específico en la secuencia de aminoácidos puede afectar la estructura y/o la función; las técnicas de evolución dirigida utilizan ciclos sucesivos de generación de diversidad genética al azar y selección o tamizaje de variantes con las propiedades deseadas; por último, en el diseño de proteínas de novo se genera una proteína completamente nueva desde cero utilizando principios fisicoquímicos. En este momento los mejores resultados se obtienen utilizando combinaciones de estas tres visiones, lo cual ha permitido la creación de plegamientos no existentes en la naturaleza y de enzimas con actividades novedosas y en términos generales ha permitido investigar los principios fundamentales de la biología molecular.

Abstract

Protein design is the process of designing or modifying proteins so that they have a specific structure and function. This involves using techniques from molecular biology, bioinformatics, and chemistry to design proteins with new properties, such as increased stability, enhanced enzyme activity, or affinity for a specific molecule. There are three complementary approaches to carry out these designs: a rational protein approach based on understanding the structure and function of existing proteins to predict how a specific change in the amino acid sequence might affect the structure and function of the protein; the use of directed evolution techniques based on successive cycles of random generation of genetic diversity and selection or screening of variants with the desired properties; finally de novo protein design where a completely new protein is generated from scratch, using physicochemical principles. At this moment, the best results are obtained using combinations of these three visions, allowing the creation of enzymes with de novo activities, folds that do not exist in nature and, in general terms, contributing to our understanding of the fundamental principles of molecular biology.

Palabras clave: Plegamiento, estructura de proteínas, Ingeniería de proteínas, evolución dirigida.

Keywords: protein folding, protein structure, protein engineering, directed evolution.

El código genético y el diseño de proteínas

Las proteínas llevan a cabo una gran variedad de funciones, entre las cuales se encuentran la estructura, el transporte y el reconocimiento molecular. Gracias a ellas podemos catalizar un sinnúmero de reacciones que nos permiten transformar moléculas para obtener y utilizar la energía contenida en sus enlaces. Las proteínas han sido fundamentales en la evolución de todos los organismos de este planeta, ya que nos han permitido utilizar los recursos del medio, así como adaptarnos a los cambios ambientales. El diseño de proteínas tiene como objetivo entender la relación entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas para diseñar catalizadores y nanomateriales que nos permitan afrontar los retos actuales y futuros en energía, alimentación, salud y sustentabilidad.

El código genético se refiere a la relación que existe entre la secuencia de los genes y la función de las proteínas. La primera parte de este código, dilucidada en la década de los 50s del siglo pasado, relaciona la secuencia de nucleótidos de los genes con la secuencia de aminoácidos de las proteínas. La segunda parte del código, conocida como el “problema del plegamiento” relaciona la secuencia de aminoácidos con la estructura tridimensional de las proteínas. El campo del plegamiento de las proteínas busca comprender las bases fisicoquímicas y el mecanismo molecular por el cual las secuencias de aminoácidos adoptan una estructura tridimensional particular estable [1,2]. La primera secuencia de aminoácidos de una proteína se determinó experimentalmente en 1951, actualmente, gracias a la secuenciación de genes, conocemos la secuencia de aminoácidos de aproximadamente 500 millones de proteínas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) La primera estructura de una proteína se determinó en 1965, actualmente (Marzo de 2023) gracias a la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear y la microscopía de electrones, conocemos la estructura tridimensional de poco más de 200,000 proteínas, las cuales se encuentran depositadas en el “Protein Data Bank” (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). Uno de los hitos científicos más importantes del siglo XXI es

el desarrollo de algoritmos de inteligencia artificial como AlphaFold2 [3] y RoseTTAFold [4] capaces de predecir con gran precisión, la estructura tridimensional de las proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos. Este avance ha sido posible debido a la gran cantidad de secuencias y estructuras que se han obtenido experimentalmente. Gracias a estos algoritmos, en particular AlphaFold2, actualmente contamos con modelos tridimensionales para casi 200 millones de proteínas [5] (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). El problema central del plegamiento de proteínas consiste en encontrar la estructura tridimensional adoptada por una secuencia de aminoácidos particular. El diseño de proteínas es también conocido como el “problema inverso del plegamiento de proteínas” ya que busca encontrar la secuencia de aminoácidos capaz de adoptar una estructura tridimensional particular. Para ello, este campo del conocimiento emplea una variedad de enfoques en constante evolución. A continuación, exponemos los antecedentes y las diferentes fronteras que definen al diseño de proteínas.

Diseño racional

El diseño racional mediante mutagénesis dirigida es una metodología que permite la introducción de mutaciones específicas en la secuencia de una proteína con el fin de mejorar sus propiedades físicas y funcionales. Esta aproximación, base de la ingeniería de proteínas, se fundamenta en la comprensión detallada de la estructura y función de la proteína de interés y en la identificación de los residuos clave que afectan su comportamiento. A partir de esta información, se pueden diseñar mutaciones que alteren las propiedades fisicoquímicas de la proteína, como su estabilidad, solubilidad, actividad enzimática, especificidad de unión o afinidad [1,6]. En este enfoque se asume que la estructura, estabilidad y dinámica de la proteína se perturbarán poco al mutarla. La mutagénesis dirigida se lleva a cabo mediante la introducción de mutaciones puntuales en la secuencia de DNA que codifica para la proteína, utilizando técnicas como la PCR dirigida, la síntesis de oligonucleótidos mutagénicos, la recombinación homóloga o la edición del genoma. Una vez

generadas las mutantes, se pueden evaluar sus propiedades mediante ensayos bioquímicos, estructurales y funcionales para seleccionar aquellas que presenten las características deseadas [7]. La limitación principal de este enfoque es la falta de una comprensión cabal del funcionamiento de las enzimas. En fechas recientes se publicó en esta colección un artículo sobre ingeniería de proteínas en el que se detallan las herramientas de biología molecular y bioinformáticas utilizadas por la ingeniería de proteínas [8].

Diseño computacional

Dada la complejidad de la estructura de las proteínas y la multitud de interacciones que contribuyen a la estabilidad y a la función, el análisis “racional” se ve complementado mediante diversas herramientas computacionales. La más utilizada es la suite de programas Rosetta [9,10], la cual contiene una función que evalúa la factibilidad de que una secuencia específica adopte una estructura particular.

Posteriormente, el programa muestrea otras secuencias posibles hasta encontrar aquella de menor energía. Los dos aspectos claves de los algoritmos de diseño computacional, son la función de evaluación y el protocolo de búsqueda de nuevas secuencias (Figura 1).

Como las secuencias de aminoácidos (y en general cualquier molécula) adoptan la estructura en la cual el sistema “proteína + solvente” se encuentra en un mínimo de energía, idealmente, la función de evaluación debería ser de rápida aplicación y de naturaleza enteramente fisicoquímica. Ya que el plegamiento de las proteínas es un proceso molecular, la aproximación adecuada para evaluar energéticamente una secuencia o una estructura particular, debería de estar basada en mecánica cuántica. Desafortunadamente los cálculos cuánticos no son rápidos por lo cual, las funciones de evaluación son “semi-heurísticas”, esto es, utilizan aplicaciones de mecánica clásica y términos probabilísticos relacionados con la frecuencia con la cual se observa determinada interacción en la base de datos de proteínas [9,10]. Otro punto central

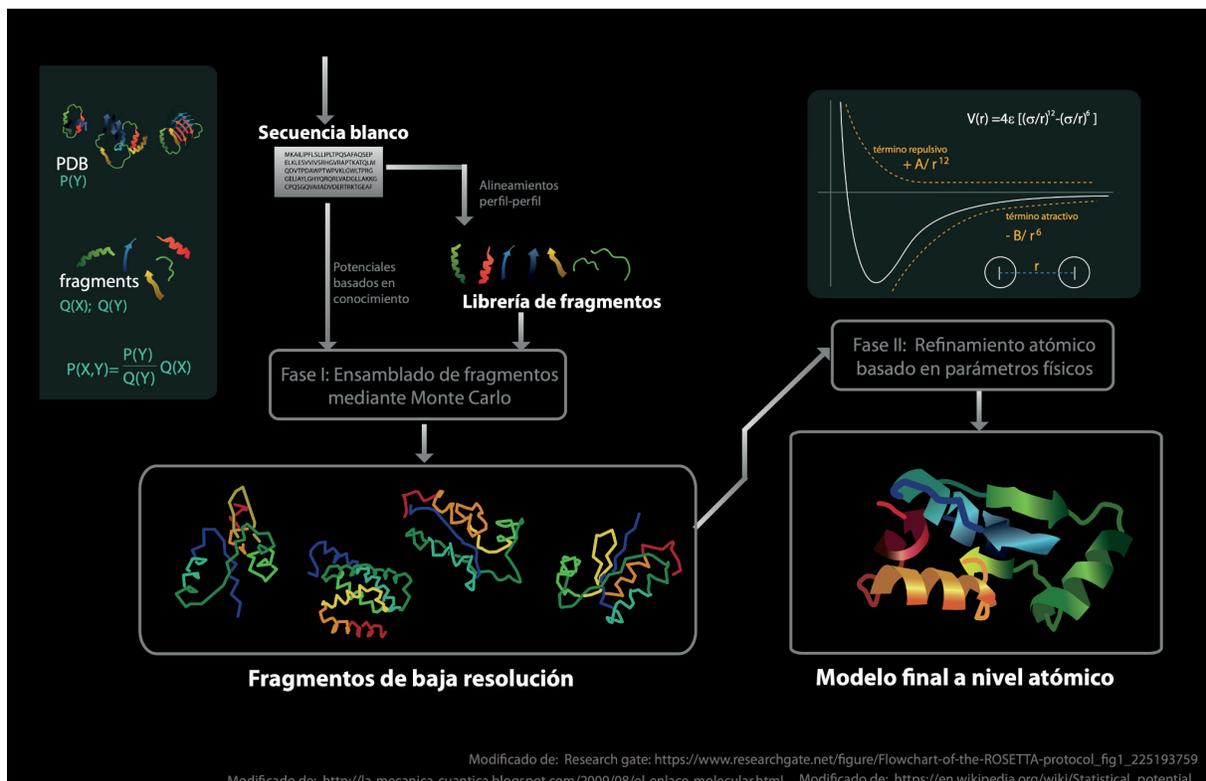


Figura 1. Diagrama conceptual del diagrama de flujo de Rosetta para el diseño de proteínas a partir de fragmentos. La primera parte incluye la generación y el ensamble de los fragmentos obtenidos a partir de las proteínas de estructura conocida, mientras que en la segunda el modelo es refinado mediante ecuaciones semi-empíricas basadas en términos energéticos y estadísticos.

en el desempeño de los algoritmos computacionales es el protocolo de muestreo. El número de posibilidades a evaluar aumenta exponencialmente con la longitud de la cadena, esto hace imposible el muestreo de todo el espacio de secuencia, debido esto, la estrategia de muestreo es fundamental, en el caso de Rosetta, éste es llevado a cabo mediante un método Montecarlo, el cual cambia aleatoriamente la secuencia y adopta los cambios encontrados cuando la energía de la nueva secuencia es menor a la obtenida antes del cambio. Por otra parte, cada residuo de la proteína puede adoptar un número elevado de conformaciones, las cuales se reducen mediante la utilización de rotámeros, los cuales corresponden a las conformaciones de las cadenas laterales más frecuentes encontradas en la base de datos.

Evolución dirigida

La evolución dirigida es una metodología de biología molecular que utiliza la selección artificial para dirigir la evolución de proteínas o ácidos nucleicos hacia una función específica deseada. Es decir, se seleccionan las mutaciones genéticas que mejoran la actividad, estabilidad, especificidad

u otra propiedad de interés en una proteína o ácido nucleico. Esta técnica se basa en la generación de una gran cantidad de variantes de una proteína o ácido nucleico mediante mutagénesis aleatoria, seguida de una selección rigurosa de las variantes que exhiben la función deseada. Las variantes seleccionadas se utilizan entonces como punto de partida para una nueva ronda de mutagénesis y selección, lo que lleva a una evolución dirigida hacia la función deseada [11,12] (Figura 2).

Una de las limitaciones de la evolución dirigida es su dependencia de la selección artificial para encontrar variantes mejoradas, lo que puede limitar su capacidad para resolver problemas complejos o mejorar múltiples características de una proteína simultáneamente. Además, la evolución dirigida puede ser limitada en su capacidad para explorar todo el espacio de secuencias posibles, lo que puede limitar la capacidad de encontrar soluciones óptimas. También existe la posibilidad de que la evolución dirigida conduzca a cambios impredecibles en la estructura o función de la proteína, lo que puede tener consecuencias no deseadas.

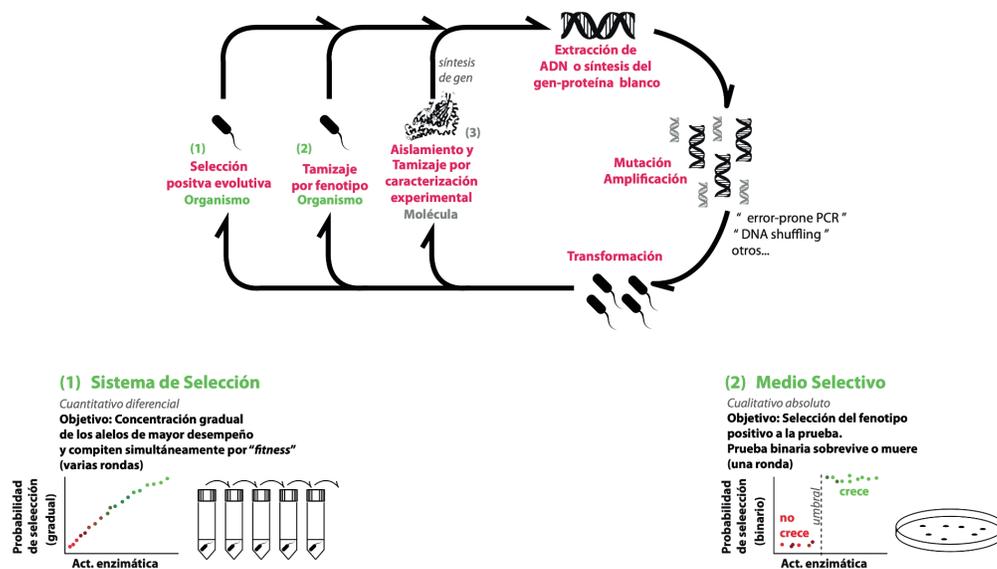


Figura 2. Diagrama conceptual de los experimentos de evolución dirigida. Esquema circular de evolución dirigida. El ciclo completo constituye una ronda. El proceso se comienza normalmente con un gen de interés por extracción o síntesis del mismo, el cual es sometido a alguna de las metodologías de mutación in vitro (la cual puede o no involucrar la multiplicación de copias o amplificación como en el caso de la PCR propensa a error). Esta segunda etapa es el motor de generación de variantes a nivel genotípico pues actúa solamente a nivel del DNA. En el siguiente paso se transforman los organismos introduciendo las variantes génicas al organismo mediante un plásmido o cromosoma bacteriano. Los organismos, así transformados, expresan el gen y sintetizan la proteína de interés que durante un proceso de selección direccional o evolución competitiva (en un sistema de selección) aumenta la frecuencia de las mejores variantes. Alternativamente, mediante un proceso de tamizaje de alto rendimiento en el cual es posible identificar el fenotipo, se seleccionan manualmente las mejores variantes para someterlas a la siguiente ronda.

Secuencias consenso

El efecto consenso en ingeniería de proteínas se refiere al proceso de identificar y utilizar las secuencias de aminoácidos de proteínas homólogas para diseñar nuevas proteínas con una función específica. Este enfoque se basa en la idea de que las secuencias conservadas en proteínas homólogas son esenciales para su función, y que la conservación a lo largo de la evolución indica que estas secuencias son importantes para la supervivencia del organismo. Por lo tanto, se cree que incorporar estas secuencias conservadas en nuevas proteínas diseñadas puede mejorar su estabilidad, plegamiento y actividad biológica [13]. En el año 2000, Lehmann y colaboradores sintetizaron la secuencia correspondiente al consenso de las trece secuencias de fitasas fúngicas conocidas a la fecha y encontraron que la enzima resultante mostró un aumento de 15 °C en la T_m y en el óptimo de actividad [14]. La conservación de regiones de la secuencia en proteínas homólogas indica que estas posiciones son importantes para la estructura y función de la proteína. Al diseñar nuevas proteínas con secuencias conservadas, se puede esperar que estas proteínas sean más estables y tengan una actividad biológica similar a la de las proteínas homólogas. Al utilizar el efecto consenso en el diseño de proteínas, se pueden reducir los errores de diseño, ya que se utilizan secuencias que han sido probadas y evolutivamente seleccionadas. Esto puede acelerar el proceso de diseño de proteínas y aumentar la probabilidad de éxito en la obtención de proteínas con una función específica [13].

Análisis de acoplamiento estadístico

Los métodos de análisis de covariación evolutiva se basan en la idea de que las proteínas y otros elementos biológicos no evolucionan de manera independiente. En lugar de ello, las mutaciones en un lugar de la secuencia pueden afectar la estabilidad o la función de otros sitios. Por esta razón, los aminoácidos en diferentes posiciones de la proteína pueden estar fuertemente correlacionados debido a la selección natural y a la coevolución.

Para llevar a cabo un análisis de covariación, se utilizan algoritmos de análisis de secuencias para identificar patrones de covariación entre posiciones en una proteína o entre proteínas relacionadas evolutivamente. Los pasos básicos

para realizar este tipo de análisis son: identificar una familia de proteínas relacionadas evolutivamente, construir una matriz de covarianza a partir de la alineación de secuencias de proteínas, identificar pares de posiciones que muestran una covariación significativa y finalmente, interpretar los pares de posiciones covariantes para inferir interacciones moleculares o características estructurales y funcionales de la proteína [15]. Tras algunos esfuerzos iniciales el primer éxito indudable de este enfoque fue logrado por el grupo de Ranganathan cuando demostraron que podían descifrar los determinantes del plegamiento de una proteína de la familia estructural de las beta-propelas. No solamente lograron diseñar péptidos con ese plegamiento, sino que también pudieron mantener sus propiedades funcionales [16,17]. Los métodos de análisis de covariación son una herramienta valiosa para identificar interacciones moleculares y otros aspectos de la estructura y función de las proteínas que no son evidentes a partir de la secuencia de aminoácidos por sí sola.

Reconstrucción de secuencias ancestrales

La reconstrucción de secuencias ancestrales es un proceso que busca inferir la secuencia de aminoácidos de un ancestro común de un grupo de proteínas relacionadas evolutivamente. Esto se logra mediante la comparación de las secuencias de las proteínas modernas y la identificación de las mutaciones que han ocurrido a lo largo del tiempo [18].

El grupo de Steven Benner utilizó técnicas de reconstrucción molecular para estudiar la historia evolutiva de la superfamilia de ribonucleasas de artiodáctilos [19]. Esta superfamilia tiene un papel importante en la digestión de los alimentos, en particular en la degradación de ácidos ribonucleicos. Mediante la reconstrucción filogenética, descubrieron que las ribonucleasas de artiodáctilos evolucionaron a partir de una fosfolipasa. También, utilizaron técnicas de ingeniería de proteínas para estudiar cómo la evolución de estas proteínas ha afectado su función permitiendo nuevas funciones, como la capacidad de descomponer los ácidos nucleicos [19].

La reconstrucción de secuencias ancestrales es útil en la ingeniería de proteínas, ya que puede ayudar a identificar características evolutivas conservadas, optimizar propiedades bioquímicas y comprender las vías evolutivas que condujeron a la diversificación de las proteínas. Estas

aplicaciones pueden tener implicaciones importantes en el diseño de proteínas con características específicas, como estabilidad o actividad enzimática, y en la comprensión de cómo las proteínas han evolucionado para adaptarse a diferentes funciones biológicas. Entre las características deseables de las proteínas ancestrales se encuentran su alta termoestabilidad y la promiscuidad catalítica, la cual las convierte en un buen punto de partida para el diseño de nuevas funciones [18, 20].

Diseño de proteínas *de novo*

Aunque el número de estructuras encontradas en la naturaleza es muy vasto, el número posible de secuencias es en términos prácticos infinito, por lo que la fracción del espacio de secuencia ocupado por las secuencias naturales es muy pequeño. El diseño de proteínas *de novo* busca explorar y extender el espacio de secuencia mediante el diseño computacional de proteínas cuya topología y/o secuencia no ha sido muestreado por la evolución natural. En contraste con las alternativas descritas anteriormente, en el diseño *de novo* el esqueleto o andamio “es” el objetivo inicial. El esqueleto puede ser generado por el usuario a partir de fragmentos de estructuras obtenidas del PDB o mediante ecuaciones paramétricas. Posteriormente, las cadenas laterales se agregan mediante procedimientos semejantes a

los descritos anteriormente, esto es, mediante algoritmos que exploran y califican diferentes rotámeros en cada posición. En 1993 se publicó el diseño de “Top7”, una proteína de poco menos de 100 residuos, cuya topología fue diseñada computacionalmente, esto es, no se observa en la naturaleza [21]. Posteriormente, en 2012, el mismo grupo describió una serie de reglas que describen la relación entre la longitud de los elementos de estructura secundaria y las asas que los conectan, en la formación de motivos de estructura terciaria como el $\beta\beta\alpha$, $\alpha\beta\beta$, $\beta\alpha\beta$. Estas reglas fueron utilizadas para el diseño de cinco proteínas idealizadas con diferente topología [22]. En trabajos subsecuentes, ha sido posible diseñar una gran variedad de estructuras, que incluye proteínas con simetría interna, toroides α helicoidales, barriles TIM, y proteínas repetitivas. Además del diseño exitoso de proteínas monoméricas (Figura 3) posible diseñar homooligómeros y heterooligómeros con la capacidad de formar *lattices* bidimensionales y compartimentos tridimensionales (Figura 4)[23].

La caracterización fisicoquímica del plegamiento de proteínas diseñadas *de novo*, permite explorar el paisaje conformacional de regiones previamente desconocidas del espacio de secuencia [24]. A pesar de que el diseño *de novo* ha avanzado significativamente en las últimas décadas y se han generado una gran cantidad de esqueletos novedosos [25,26], aún presenta limitaciones importantes, particularmente en lo relacionado a la introducción de función.

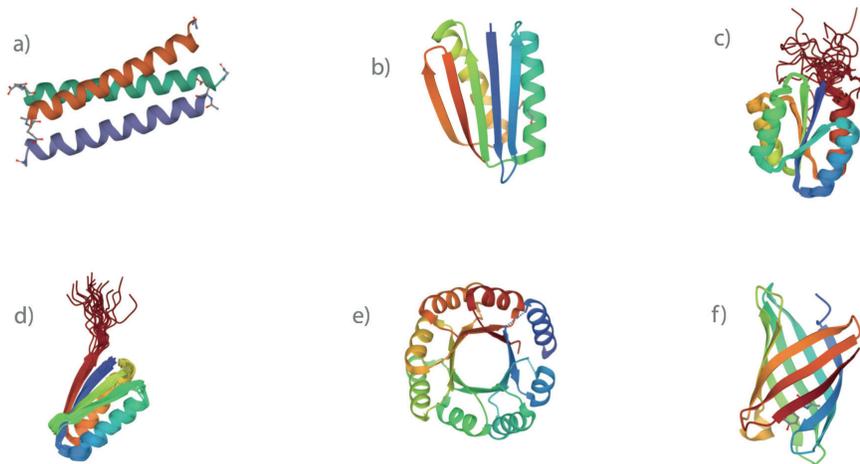


Figura 3. Estructuras representativas de proteínas monoméricas diseñadas *de novo*. Se muestra el esqueleto polipeptídico de las siguientes estructuras: a) Manojos de alfa-hélices (PDB 1COS), b) Top7 la primer estructura diseñada no observada en la naturaleza (PDB ID 1QYS) c) Plegamiento tipo Rossmann (PDB ID 2KPO), d) Plegamiento tipo ferredoxina (PDB ID 2KL8), e) Barril TIM (PDB ID 5VBL) f) Barril Beta (PDB ID 6CZH).

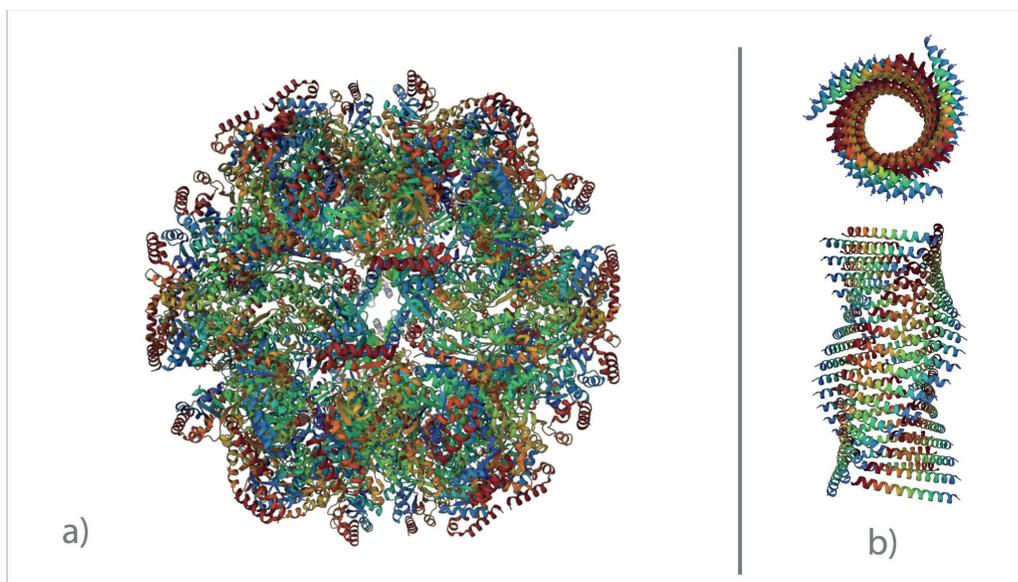


Figura 4. Estructuras representativas de proteínas oligoméricas diseñadas de novo. Se muestra el esqueleto polipeptídico de las siguientes estructuras: a) Compartimento icosaédrico de dos componentes (PDB 5IM5) B) Filamento helicoidal (PDB ID 6WL1).

Catálisis *de novo*: Diseño computacional y mediante consideraciones evolutivas

Los primeros trabajos relacionados con el diseño de enzimas buscaron alterar la especificidad, para ello, se utilizaron como andamio enzimas naturales a las cuales se les modificaron algunos residuos que permitieron obtener enzimas con especificidades distintas y en algunos pocos casos con actividades catalíticas distintas [27]. Utilizar enzimas, naturales u obtenidas por evolución dirigida, con actividades promiscuas como punto de partida para obtener nuevas actividades mediante evolución dirigida tiene varias ventajas. En primer lugar, la existencia de la maquinaria catalítica esencial para llevar a cabo una reacción, aunque la velocidad inicial sea baja, aumenta la probabilidad de que una mutación mejore la actividad deseada ya que se construye sobre una base existente, lo cual puede ahorrar tiempo y recursos en comparación con el diseño *de novo*. Las enzimas con actividades promiscuas también ofrecen la posibilidad de utilizar sustratos relacionados, con posibles aplicaciones industriales o biotecnológicas. Finalmente, estas enzimas a menudo tienen una mayor estabilidad y solubilidad que las enzimas completamente nuevas, lo que facilita su producción y uso a gran escala. La factibilidad de este enfoque depende

de poder encontrar estos puntos de partida y sobre todo de tener un sistema de selección que permita identificar las variantes con capacidades mejoradas, lo cual no es siempre posible.

La contraparte ha sido el uso de teozimas, ('enzimas teóricas') las cuales son modelos tridimensionales de los grupos funcionales requeridos para estabilizar al estado de transición de acuerdo a la geometría predicha mediante cálculos fisicoquímicos. El siguiente paso consiste en encontrar el andamio idóneo para insertar la teozima, generalmente en una región cercana al sitio original de la enzima. A pesar de la solidez conceptual de esta aproximación y de los primeros ejemplos alentadores reportados [28,29], las eficiencias catalíticas reportadas distan de las encontradas en las enzimas naturales, por lo cual es necesario utilizar posteriormente otros enfoques. En el caso particular del diseño de una enzima capaz de llevar a cabo la eliminación de Kemp [28] después de 17 rondas de evolución dirigida, se logró obtener una enzima cuya eficiencia catalítica es semejante a la encontrada en las enzimas naturales [30]. A pesar de las limitaciones actuales en el diseño computacional de enzimas, esta metodología ha avanzado sustancialmente en los últimos años y continúa evolucionando [31].

Diseño de proteínas utilizando herramientas de inteligencia artificial

Los enfoques de inteligencia artificial y aprendizaje de máquinas pueden contribuir significativamente al diseño de experimentos de evolución dirigida al mejorar la eficiencia y la efectividad de los procesos de selección y optimización. Estos enfoques pueden automatizar gran parte del proceso de diseño de experimentos, lo que reduce la necesidad de intervención humana y aumenta la velocidad en la obtención de resultados [32]. Por ejemplo, los algoritmos de aprendizaje automático pueden utilizarse para predecir el comportamiento de mutaciones puntuales y sus combinaciones. Esto puede ayudar a los investigadores a enfocar su tiempo y recursos en experimentos más prometedores y evitar caminos menos productivos. Otra aplicación de la inteligencia artificial en la evolución dirigida es el uso de algoritmos de aprendizaje por refuerzo para optimizar el rendimiento de las moléculas biológicas, los cuales ayudan a encontrar la combinación óptima de mutaciones requeridas para lograr un objetivo deseado, como mejorar la actividad enzimática o la afinidad de un ligando [32].

Aunque estos enfoques híbridos tienen un gran potencial, todavía hay áreas de oportunidad para mejorar su eficacia y aplicabilidad en el diseño de experimentos de evolución dirigida. En particular, la calidad y cantidad de los datos utilizados para entrenar los algoritmos de aprendizaje automático, así como la integración de información estructural y bioquímica, puede mejorar la capacidad de los algoritmos para predecir el comportamiento de las proteínas y mejorar la eficiencia y la efectividad de los procesos de selección y optimización.

Perspectivas

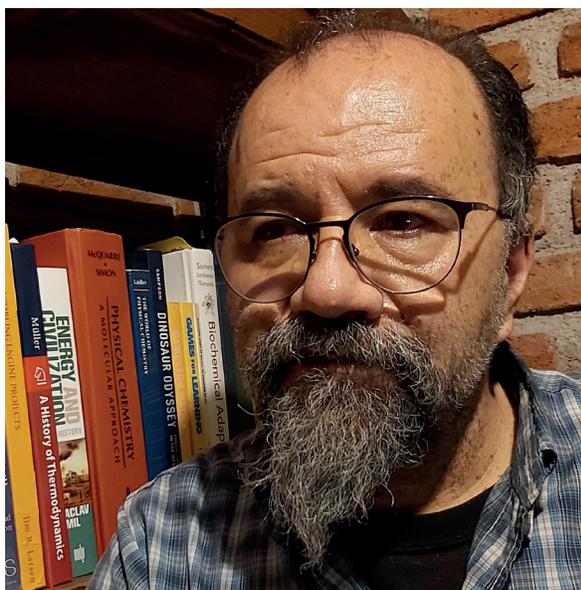
El diseño de proteínas *de novo* ha sido tratado históricamente como un problema de optimización energética, esto es, encontrar la secuencia de aminoácidos que presenta la mejor energía para una estructura particular. El problema es complejo y computacionalmente costoso ya que el número de secuencias a evaluar es inmenso y la función de energía utilizada es aproximada. En la introducción mencionamos como algoritmos de inteligencia artificial como AlphaFold y RoseTTafold han revolucionado la ciencia contemporánea

gracias a su habilidad para “resolver” el problema del plegamiento; esto es, predecir con precisión la estructura tridimensional a partir de la secuencia de aminoácidos. Este tipo de metodologías también pueden utilizarse para atacar el problema inverso, es decir para diseñar proteínas. Recientemente se han reportado protocolos de diseño que utilizan herramientas de aprendizaje profundo para el diseño de proteínas [33-36]. Estas nuevas herramientas expanden significativamente las fronteras del diseño de proteínas, poniendo a nuestro alcance el diseño exitoso de nuevas enzimas y nanomateriales con una amplia gama de aplicaciones, las cuales serán centrales en la solución de los problemas que enfrenta la humanidad.

Referencias

1. Fersht AR. (2008) From the first protein structures to our current knowledge of protein folding: delights and scepticisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 650-654.
2. Dill KA, MacCallum JL. (2012) The protein-folding problem, 50 years on. *Science.* **338**, 1042-1046.
3. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* **596**, 583-589.
4. Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, Dauparas J, Ovchinnikov S, Lee GR, Wang J, Cong Q, Kinch LN, Schaeffer RD, Millán C, Park H, Adams C, Glassman CR, DeGiovanni A, Pereira JH, Rodrigues AV, van Dijk AA, Ebrecht AC, Opperman DJ, Sagemester T, Buhheller C, Pavkov-Keller T, Rathinaswamy MK, Dalwadi U, Yip CK, Burke JE, Garcia KC, Grishin NV, Adams PD, Read RJ, Baker D. (2021) Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science.* **373**, 871-876.
5. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Židek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis D, Velankar S. (2022) AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* **50(D1)**, 8, 292-295.
6. Fersht A, Winter G. (1992) Protein engineering. *Trends Biochem Sci.* **8**, 292-295.
7. Lutz S, Iamurri SM. (2018) Protein Engineering: Past, Present, and Future. *Methods Mol Biol.*;1685:1-12.
8. Miranda-Zaragoza B, Ramirez-Carreto S, Rodríguez-Almazán C. (2021) Ingeniería de proteínas *Mensaje Bioquímico* **45**, 48-58.
9. Kaufmann KW, Lemmon GH, Deluca SL, Sheehan JH, Meiler J. (2010) Practically useful: what the Rosetta protein modeling suite can do for you. *Biochemistry.* **49**, 2987-2998.
10. Lemn JK, Weitzner BD, Lewis SM, Adolf-Bryfogle J, Alam N, Alford RF, Aprahamian M, Baker D, Barlow KA, Barth P, Basanta B, Bender BJ, Blacklock K, Bonet J, Boyken SE, Bradley P, Bystroff C, Conway P, Cooper S, Correia BE, Coventry B, Das R, De Jong RM, DiMaio F, Dsilva L, Dunbrack R, Ford AS, Frenz B, Fu DY, Geniesse C, Goldschmidt L, Gowthaman R, Gray JJ, Gront D, Guffy S, Horowitz S, Huang PS, Huber T, Jacobs TM, Jeliazkov JR, Johnson DK, Kappel K,

- Karanicolas J, Khakzad H, Khar KR, Khare SD, Khatib F, Khrumushin A, King IC, Kleffner R, Koepnick B, Kortemme T, Kuenze G, Kuhlman B, Kuroda D, Labonte JW, Lai JK, Lapidoth G, Leaver-Fay A, Lindert S, Linsky T, London N, Lubin JH, Lyskov S, Maguire J, Malmström L, Marcos E, Marcu O, Marze NA, Meiler J, Moretti R, Mulligan VK, Nerli S, Norm C, ÓConchúir S, Ollikainen N, Ovchinnikov S, Pacella MS, Pan X, Park H, Pavlovicz RE, Pethe M, Pierce BG, Pilla KB, Raveh B, Renfrew PD, Burman SSR, Rubenstein A, Sauer MF, Scheck A, Schief W, Schueler-Furman O, Sedan Y, Sevy AM, Sgourakis NG, Shi L, Siegel JB, Silva DA, Smith S, Song Y, Stein A, Szegedy M, Teets FD, Thyme SB, Wang RY, Watkins A, Zimmerman L, Bonneau R. (2020) Macromolecular modeling and design in Rosetta: recent methods and frameworks. *Nat Methods*. **17**, 665-680.
11. Arnold FH. (2015) The nature of chemical innovation: new enzymes by evolution. *Q Rev Biophys*. **48**, 404-410.
 12. Arnold FH. (2018) Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angew Chem Int Ed Engl*. **57**, 4143-4148.
 13. Porebski BT, Buckle AM. (2016) Consensus protein design. *Protein Eng Des Sel*. **29**, 245-251.
 14. Lehmann M, Loch C, Middendorf A, Studer D, Lassen SF, Pasamontes L, van Loon AP, Wyss M. (2002) The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein Eng*. **15**, 403-411.
 15. Lockless SW, Ranganathan R. (1999) Evolutionarily conserved pathways of energetic connectivity in protein families. *Science*. **286**, 295-299.
 16. Socolich M, Lockless SW, Russ WP, Lee H, Gardner KH, Ranganathan R. (2005) Evolutionary information for specifying a protein fold. *Nature*. **437**, 512-518.
 17. Russ WP, Lowery DM, Mishra P, Yaffe MB, Ranganathan R. (2005) Natural-like function in artificial WW domains. *Nature*. **437**, 579-583.
 18. Hochberg GKA, Thornton JW. (2017) Reconstructing Ancient Proteins to Understand the Causes of Structure and Function. *Annu Rev Biophys*. **46**, 247-269.
 19. Jermann TM, Opitz JG, Stackhouse J, Benner SA. (1995) Reconstructing the evolutionary history of the artiodactyl ribonuclease superfamily. *Nature*. **374**, 57-59.
 20. Spence MA, Kaczmarek JA, Saunders JW, Jackson CJ. Ancestral sequence reconstruction for protein engineers. (2021) *Curr Opin Struct Biol*. **69**, 131-141.
 21. Kuhlman B, Dantas G, Ireton GC, Varani G, Stoddard BL, Baker D. (2003) Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science*. **302**, 1364-1368.
 22. Koga N, Tatsumi-Koga R, Liu G, Xiao R, Acton TB, Montelione GT, Baker D. (2012) Principles for designing ideal protein structures. *Nature*. **491**, 222-227.
 23. Huang PS, Boyken SE, Baker D. (2016) The coming of age of de novo protein design. *Nature*. **537**, 320-327.
 24. Romero-Romero S, Costas M, Silva Manzano DA, Kordes S, Rojas-Ortega E, Tapia C, Guerra Y, Shanmugaratnam S, Rodríguez-Romero A, Baker D, Höcker B, Fernández-Velasco DA. (2021) The Stability Landscape of de novo TIM Barrels Explored by a Modular Design Approach. *J Mol Biol*. **433**, 167153.
 25. Korendovych IV, DeGrado WF. (2020) De novo protein design, a retrospective. *Q Rev Biophys*. **53**:e3.
 26. Woolfson DN. (2021) A Brief History of De Novo Protein Design: Minimal, Rational, and Computational. *J Mol Biol*. **433**, 167160.
 27. Peimbert M, Segovia L. Evolutionary engineering of a beta-Lactamase activity on a D-Ala D-Ala transpeptidase fold. (2003) *Protein Eng*. **16**, 27-35.
 28. Röthlisberger D, Khersonsky O, Wollacott AM, Jiang L, DeChancie J, Betker J, Gallaher JL, Althoff EA, Zanghellini A, Dym O, Albeck S, Houk KN, Tawfik DS, Baker D. (2008) Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*. **453**, 190-195.
 29. Jiang L, Althoff EA, Clemente FR, Doyle L, Röthlisberger D, Zanghellini A, Gallaher JL, Betker JL, Tanaka F, Barbas CF 3rd, Hilvert D, Houk KN, Stoddard BL, Baker D. (2008) De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science*. **319**, 1387-1391.
 30. Blomberg R, Kries H, Pinkas DM, Mittl PR, Grütter MG, Privett HK, Mayo SL, Hilvert D. (2013) Precision is essential for efficient catalysis in an evolved Kemp eliminase. *Nature*. **503**, 418-421.
 31. Lovelock SL, Crawshaw R, Basler S, Levy C, Baker D, Hilvert D, Green AP. (2022) The road to fully programmable protein catalysis. *Nature*. **606**, 49-58.
 32. Yang KK, Wu Z, Arnold FH. (2019) Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering. *Nat Methods*. **16**, 687-694.
 33. Anishchenko I, Pellock SJ, Chidyausiku TM, Ramelot TA, Ovchinnikov S, Hao J, Bafna K, Norm C, Kang A, Bera AK, DiMaio F, Carter L, Chow CM, Montelione GT, Baker D. (2021) De novo protein design by deep network hallucination. *Nature*. **600**, 547-552.
 34. Dauparas J, Anishchenko I, Bennett N, Bai H, Ragotte RJ, Milles LF, Wicky BIM, Courbet A, de Haas RJ, Bethel N, Leung PJY, Huddy TF, Pellock S, Tischer D, Chan F, Koepnick B, Nguyen H, Kang A, Sankaran B, Bera AK, King NP, Baker D. (2022) Robust deep learning-based protein sequence design using ProteinMPNN. *Science*. **378**, 49-56.
 35. Ferruz N, Schmidt S, Höcker B. (2022) ProtGPT2 is a deep unsupervised language model for protein design. *Nat Commun*. **13**, 4348.
 36. Ferruz N, Heinzinger M, Akdel M, Goncarenco A, Naef L, Dallago C. (2022) From sequence to function through structure: Deep learning for protein design. *Comput Struct Biotechnol J*. **21**, 238-250.



**DR. DANIEL ALEJANDRO
FERNÁNDEZ VELASCO**
ORCID ID 0000-0003-2368-6378

Cursó la licenciatura en la Universidad Iberoamericana y la maestría y el doctorado en Investigación Biomédica Básica en la UNAM. Es Profesor de tiempo completo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM desde 1995, forma parte del laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas. Ha publicado 48 artículos de investigación en revistas de alto impacto y varios capítulos de libros y tiene numerosas contribuciones de divulgación de la ciencia a distintos niveles. El Dr. Fernández tiene una fuerte participación en la formación de recursos humanos, ha graduado a 7 alumnos de doctorado, 8 de maestría y 17 de licenciatura, y ha impartido continuamente cursos a nivel licenciatura y posgrado en diversos programas académicos de la UNAM. Recibió el reconocimiento Distinción Universidad Nacional para Jóvenes Académicos en el área de Docencia en Ciencias Naturales en 2006. Sus líneas de investigación son el plegamiento, la evolución y el diseño de proteínas. Ha participado en la organización de varios congresos nacionales de la rama de proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.



LORENZO SEGOVIA
ORCID ID: 0000-0002-4291-4711

Cursó la Licenciatura, la Maestría y el Doctorado en Investigación Biomédica Básica en la UNAM. Obtuvo el grado de Doctor en 1990 con Mención Honorífica y fue contratado en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM. De 1992 a 1994 realizó un postdoctorado en los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU (NIH) con una beca Fogarty. Se reincorporó en 1994 al Instituto de Biotecnología de la UNAM. Su grupo estudia la evolución y manipulación de la relación estructura-función de enzimas, así como la evolución del metabolismo y la utilización de redes neurales para el diseño de proteínas. El Dr. Segovia es autor de 52 trabajos de investigación originales los cuales han sido citados más de 2600 veces. Ha publicado dos artículos de divulgación en revistas de muy alto impacto y 14 capítulos en libros tanto de divulgación como de investigación. Ha sido invitado a presentar en numerosos congresos internacionales y ha participado como organizador en cuatro Congresos Internacionales.



ENRIQUE HURTADO BAUTISTA

ORCID ID: 0000-0002-8143-6193

Originario del centro-occidente del país, y con intereses generales en Historia de la Ciencia, Historia de las Matemáticas, Arte, Pintura, Química, Microbiología y Evolución, fue inicialmente formado en Ingeniería Química en la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad de Colima (1999). Hizo posteriormente estudios en Licenciatura en Diseño para la Comunicación Gráfica en la Universidad de Guadalajara (2005) enfocándose en ilustración, diseño de marca y psicología de la imagen y tratando de reunir información técnica científica con técnicas de representación visual: *Technical Documentation*. En sus estudios de maestría en la Universidad de Guadalajara (2010) vuelve al área bioquímica y a la microbiología de los alimentos. La educación académica la finaliza en el doctorado en Cinvestav Unidad Irapuato (2014) en Biotecnología de plantas con enfoque en la evolución experimental, y genómica bacteriana. Actualmente cursa una estancia postdoctoral en la Universidad Nacional Autónoma de México en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteína de la Facultad de Medicina.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 58-67

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Subtipo como herramienta potenciadora en análisis de asociación de genoma completo.

Genotype subtyping as an enhancer tool in genome-wide association analysis.

Treviño, Víctor ^{1,2,3,*} y Garza-Hernández, Debora ¹

¹Tecnológico de Monterrey, The Institute for Obesity Research, Monterrey, México

²Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, México

³Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Monterrey, México

*Correspondencia. Escuela de Medicina, Dirección de Investigación Nacional, Bioinformática y Diagnóstico Clínico. Edificio CITES 304, Tecnológico de Monterrey, Col. Doctores, Monterrey, Nuevo León (México), C.P. 64710. Tel: +52 (181) 8888-2045, vtrevino@tec.mx

Resumen

Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) consisten en evaluar la relación entre uno fenotipo en particular y miles de variantes genéticas. La heredabilidad mide la proporción del fenotipo que se puede atribuir a factores genéticos. Diversos estudios muestran una que la heredabilidad explicada por las variantes significativas en los estudios de GWAS son menores que las estimadas en estudios familiares. Por lo tanto, se requieren nuevos métodos que puedan identificar más variantes de los estudios GWAS clásicos. En este manuscrito describiremos la estrategia *subtipo genotípico* que promete ser una herramienta útil para GWAS. Esta estrategia se ha evaluado independientemente por al menos dos grupos, nosotros para una variante asociada a la enfermedad de Crohn y otros para el abuso de alcohol en un metaanálisis en población japonesa. Bajo la premisa de que la enfermedad de Crohn podía estar compuesta de diferentes genotipos y con el fin de determinar la importancia del marcador identificado y su posible interacción con otros genes ya previamente asociados a Crohn, se procedió a generar un GWAS separando por subtipos las muestras en base a los

Abstract

Genome-wide association studies (GWAS) evaluate the relationship between a specific phenotype and thousands of genetic variants. Heritability measures the proportion of the phenotype that can be attributed to genetic factors. Several studies show that the heritability explained by the significant variants in the GWAS studies is lower than those estimated in family studies. Therefore, new methods are required to identify more variants of classical GWAS studies. This manuscript will describe the genotype subtyping strategy that promises to be a useful tool for GWAS. This strategy has been evaluated independently by at least two research teams, our group for a variant associated with Crohn's disease and another for alcohol abuse in a meta-analysis in a Japanese population. Under the premise that Crohn's disease could be composed of different genotypes and to determine the importance of the identified marker and its possible interaction with other genes previously associated with Crohn's, a GWAS was generated, separating the samples by subtypes, based on the genotypes of a well-known variant in Crohn's. Under this analysis, another 49 significant associations were

genotipos de una variante muy conocida en Crohn. Bajo este análisis, se identificaron otras 49 asociaciones significativas, de las cuales 12 muestran una interacción significativa con la variante usada en el subtipo. Por otro lado, otro grupo de investigación prueba la hipótesis de que algunas variantes asociadas con el consumo de alcohol podían exhibir una asociación dependiente a un genotipo conocido fuertemente asociado al consumo de alcohol donde los autores realizaron un análisis similar, por subtipos. Encontraron 3 genes que no habían sido identificados en ningún GWAS y también con interacción con la variante original. Por lo tanto, el *subtipo genotípico* podría detectar locus que no pudieron identificarse en análisis de GWAS convencionales.

Palabras clave: GWAS, Heredabilidad, Subtipo genotípico, Enfermedades complejas, Asociación de Genoma Completo.

identified, of which 12 show a significant interaction with the variant used in the subtyping. The second research group tested the hypothesis that some variants associated with alcohol consumption could exhibit a dependent association with a known genotype strongly associated with alcohol consumption, where the authors carried out a similar analysis by subtypes. They found three genes that had not been identified in any GWAS and also with interaction with the original variant. Therefore, genotype subtyping could detect loci not identified in conventional GWAS analyses.

Keywords: GWAS, heritability, genotype subtyping, complex diseases.

Introducción

GWAS y su importancia en la identificación de variantes comunes

Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) consisten en evaluar la relación entre uno fenotipo en particular y miles de variantes genéticas distribuidas a lo largo del genoma. Las variantes más comunes que son analizadas mediante los estudios de GWAS son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que consisten en cambios de una sola base nitrogenada en la secuencia de ADN. Estos estudios cumplen con una estricta metodología que está muy bien descrita (Figura 1). Se inicia con la recolección de datos de miles de sujetos del fenotipo en cuestión incluyendo

controles; le sigue el genotipado de miles de SNP donde existen distintas plataformas de microarreglos; el control de calidad tanto de variantes como de muestras para evitar falsos positivos debido a características de las muestras (como tamaño, ancestría, y parentesco, entre otros); la imputación de más marcadores con un panel de referencia para aumentar la cantidad de SNPs; y la prueba de asociación para detectar las variantes asociadas al fenotipo y final y opcionalmente la selección de modelo (como aditivos, no aditivo, regresión lineal o regresión logística, prueba de chi-cuadrada, entre otras). Estudios adicionales, como meta-análisis de GWAS, replicación de variantes en otras cohortes o análisis funcionales, es lo que regularmente puede continuar para los estudios de GWAS (1).

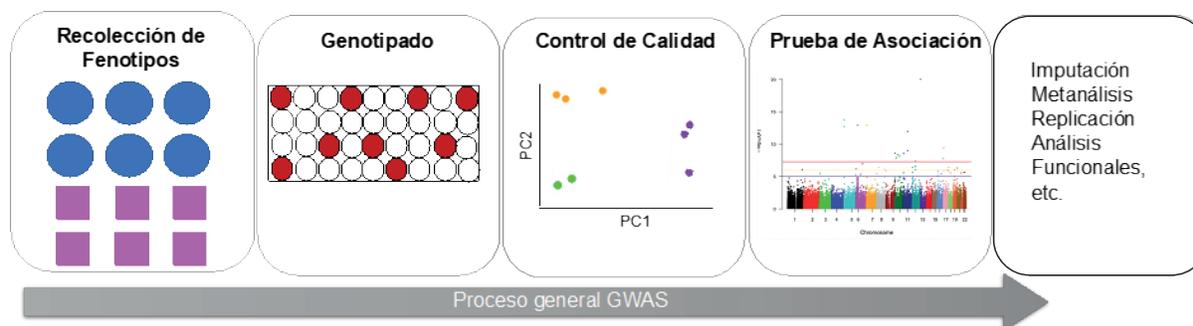


Figura 1. Esquema general de un análisis de asociación de genoma completo, adaptado Uffelmann *et al.*, 2021 (1).

Las aplicaciones de este tipo de estudios son muy amplias. Por ejemplo, se puede comprender la función biológica de algunas variantes, predecir riesgo a enfermedades, o desarrollo de medicamentos al identificar blancos terapéuticos (1, 2). Sin embargo, existen algunas limitaciones que han sido documentadas para estos análisis como la penalización que sufre debido a las pruebas múltiples debido a la gran cantidad

de variantes a probar, en donde una variante es considerada significativa solo si el valor de probabilidad es menor a 5×10^{-8} . Esto origina que se requieran grandes tamaños de muestras para contrarrestarlo (3). Los GWAS no siempre identifican la variante causal del fenotipo estudiado. Por ejemplo, no son efectivos para identificar epistasis (4) y son muy afectados por la estructura poblacional (relación entre individuos) (5).

Además, solo puede identificar variantes que se encuentran en el panel utilizado, así como la imposibilidad de detectar variantes raras que contribuyan a la enfermedad (2).

Búsqueda de genes de susceptibilidad en enfermedades complejas

Para dimensionar la importancia de los estudios GWAS y como recurso para obtener información existe GWASCatalog, una base de datos de resultados que contiene a la fecha 6263 publicaciones de estudios de GWAS, a través de los cuales se han identificado 487,213 asociaciones para distintas características, incluyendo enfermedades complejas (6) structured, standardised and interoperable genome-wide association study (GWAS). Las enfermedades o características complejas son las condiciones poligénicas que pueden ser el resultado de variantes raras o de baja frecuencia que en conjunto proveen pequeños efectos sobre el fenotipo (7). Los estudios de GWAS han identificado genes asociados a enfermedades complejas como cardiovasculares, diabetes tipo 2, desórdenes psiquiátricos, obesidad, altura, cáncer, entre muchos otros (8, 9). La altura de una persona por ejemplo es una de las características complejas más estudiadas, a partir de marcadores de SNPs, se puede explicar de un 40-50% de

varianza fenotípica (10).

En un estudio reciente aplicado a una población de 5.4 millones de individuos, se pudo determinar que 12,111 SNPs independientes, podían explicar prácticamente toda la heredabilidad para altura basada en marcadores comunes SNPs (10).

Heredabilidad perdida y el impacto de GWAS en su explicación

Los estudios familiares y de gemelos han permitido determinar la heredabilidad de algunas características, especialmente aquellas que tienen un alto componente genético (Tabla I). No obstante, los estudios de GWAS muestran una discrepancia en relación a la heredabilidad de las características, comparando con los resultados reportados en estudios familiares (11). Esto puede deberse a diferentes circunstancias, como la eliminación de variantes que tienen una frecuencia menor al 5% en la población de estudio, la falta de modelos que evalúen las interacciones entre genes y marcadores, los efectos ambientales, entre otros (4, 12). Esto quiere decir que se requieren técnicas más sofisticadas o datos más profundos para calcular toda la heredabilidad explicable genéticamente.

Tabla I. Proporción de heredabilidad explicada para enfermedades complejas en estudios familiares.

Enfermedad	% de h ² explicada	Tipo de estudio	Ref.
Enfermedad de Crohn	75%	Gemelos	(13)
Trastorno por Consumo de Alcohol	50%	Gemelos	(14)
Degeneración Macular	50%	Riesgo en hermanos	(15)
Lupus Eritematoso Sistémico	15%	Riesgo en hermanos	(16)
Diabetes Tipo 2	72%	Gemelos	(17)
Púrpura Trombocitopénica Idiopática	71%	Médicos familiares	(18)
Sobrepeso	71%	Médicos familiares	(18)
Enfermedad Celiaca	78%	Médicos familiares	(18)
Trastorno Mixto Ansioso Depresivo	95%	Médicos familiares	(18)
Glaucoma primario de ángulo abierto	93%	Médicos familiares	(18)
Soplos Cardiacos no Diagnosticados	59%	Médicos familiares	(18)
Desordenes de otras glándulas endócrinas	60%	Médicos familiares	(18)
Hipertensión secundaria	50%	Médicos familiares	(18)

Ref Referencia, h² Heredabilidad

Subtipo genotípico como herramienta para análisis de genoma

Los GWAS requieren un tamaño de muestra superior

a los 10,000 individuos para identificar resultados estadísticamente significativos (1). Sin embargo, una gran cantidad de estudios no logran llegar a esta meta. El *subtipo genotípico* es una herramienta prometedora para el análisis de

asociación genoma completo, esta estrategia se ha evaluado para una variante asociada a la enfermedad de Crohn (19) genome-wide association studies (GWAS) y para el abuso de alcohol en un metaanálisis en población japonesa (20). En el presente documento, después de dar un repaso de las generalidades de GWAS, se evalúa la evidencia recopilada del *subtipo genotípico* con el fin de mostrar su viabilidad como herramienta potenciadora para el análisis de asociación genoma completo.

Heredabilidad y enfermedades complejas

Heredabilidad estimada para enfermedades complejas

Las enfermedades complejas son condiciones poligénicas

que pueden ser afectadas por variantes con un tamaño de efecto pequeño y con frecuencia menor al 5% en la población de estudio (7). La frecuencia alélica de una variante es un indicador de la probabilidad de detección en una población, una variante con una frecuencia menor a 0.5% (presente en 5 de cada 1000 individuos), es muy poco probable que pueda ser identificada por pruebas genéticas, a menos que el tamaño de los efectos sean muy grandes y que llamen demasiado la atención, como las enfermedades monogénicas (12). Aquellas variantes con una baja frecuencia (MAF entre 0.5 y 5%) y con un efecto intermedio aún pueden ser identificadas por pruebas genéticas como en los GWAS y contribuir a la varianza explicada de la característica (12) (Figura 2). Para detectar variantes raras, se prefieren otros métodos como secuenciación de exoma o genoma completo.

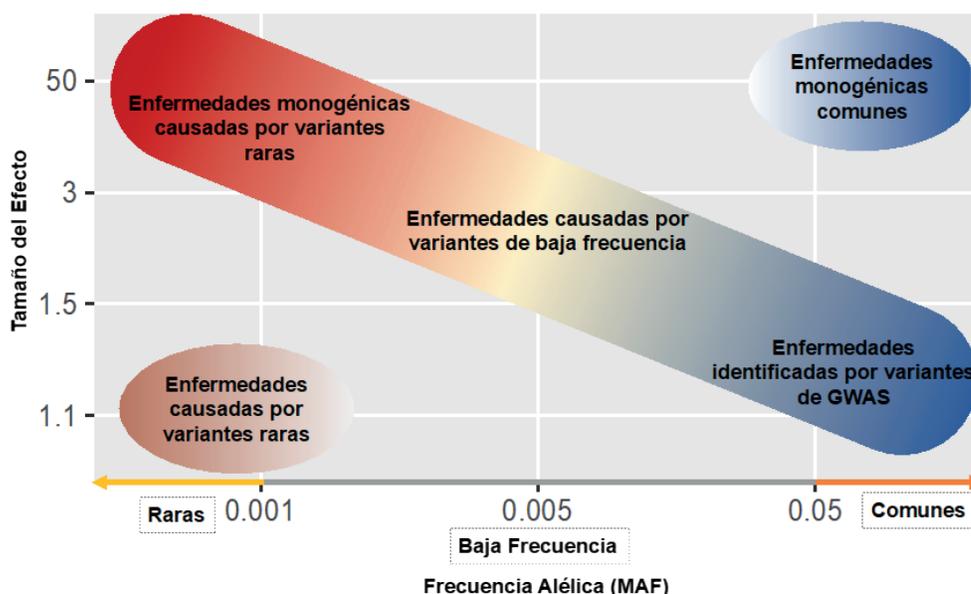


Figura 2: Factibilidad de identificación de variantes genéticas mediante frecuencia alélica y efecto genético, adaptada de Manolio et al. 2009 (12).

GWAS y su aporte a la heredabilidad

Las mediciones de heredabilidad muestran un espectro muy amplio, debido al tipo de método por el cual pudieran ser estimadas (21). Diversos estudios muestran una discrepancia significativa entre las estimaciones de heredabilidad al ser determinada mediante los marcadores identificados en estudios de GWAS (Tabla I), siendo estas últimas mucho menores que las estimadas en estudios familiares (13, 14). Se puede considerar que la heredabilidad estimada mediante GWAS está subestimada debido a su dependencia por el tamaño de muestra, lo que evitaría que algunos marcadores alcancen el umbral de detección. Además, al considerar principalmente marcadores comunes con penetrancia baja, los GWAS no pueden detectar aquellas variantes raras y/o de baja frecuencia de penetrancia alta a intermedia (12).

Ejemplo 1: T2D. La Diabetes Tipo 2 (DT2), es una enfermedad compleja y multifactorial que se caracteriza

por la combinación de factores genéticos, ambientales y metabólicos que afectan la homeostasis de la glucosa (22). Para la DT2 existen estimaciones de heredabilidad que van del 47 al 77% (17). Los estudios de asociación genética han identificado alrededor de 600 loci asociados a DT2 e implicadas en su desarrollo y patogénesis (23). Sin embargo, aunque estos estudios han sido aplicados en más de 1 millón de individuos, solo el 19% de la heredabilidad ha podido ser explicada (23).

Ejemplo 2: Capacidad pulmonar. La capacidad de difusión pulmonar, mediante monóxido de carbono, es una forma de medir el intercambio de gases en los pulmones, lo que permite evaluar la función pulmonar (24). Estudios familiares han estimado que la heredabilidad para esta característica es alrededor del 44% (25). Sin embargo, un estudio de GWAS utilizando variantes con una frecuencia mayor al 1% y aplicado a 3,286 individuos no relacionados, determinó una varianza fenotípica explicada del 23 al 24%

(26). En este GWAS la principal variante identificada es un SNP (MAF 3%) que origina un cambio de aminoácido en la cadena proteica codificada por el gen ADGRG6, este cambio tiene altas probabilidades de tener un efecto deletéreo en la proteína, por lo que se considera altamente probable que el SNP identificado en el análisis es funcional en el gen (26).

Los dos ejemplos mencionados muestran dos escenarios comunes en los estudios GWAS, la identificación de una gran cantidad de variantes asociadas, pero con una varianza explicada mucho menor comparada con la ya previamente reportada en estudios familiares y la identificación de pocas variantes para una característica moderadamente heredable con alta heredabilidad explicada (aunque no total). Este último es más exitoso por las variantes funcionales identificadas con alta probabilidad de tener una alta efecto en el desarrollo del fenotipo, lo que resulta en una menor discrepancia en lo reportado en estudios familiares contra lo identificado en estudios de GWAS. No obstante, está claro que la heredabilidad no es explicada al 100% y por lo tanto se requieren de mayores esfuerzos tanto de nuevos diseños experimentales, tamaño de muestra, y herramientas de análisis.

Variantes raras y su impacto en la explicación de la heredabilidad

Las variantes raras pueden explicar parte de la heredabilidad perdida, ya que los GWAS se enfocan a variantes comunes ligadas a variantes causales, lo que origina descartar las variantes causales raras o de baja frecuencia (27). En un estudio reciente se buscó abordar la relación entre la heredabilidad perdida y las variantes raras, mediante la estimación de la heredabilidad tanto de altura como del índice de masa corporal (IMC) de datos de genoma completo (WGS) en una muestra de 25,465 individuos no relacionados de ancestría europea (28). Estas estimaciones fueron comparadas con datos de GWAS para 1 millón de marcadores las cuales resultaron en 0.48 y 0.24 para altura y IMC respectivamente (28). Al comparar con WGS, se identificó una heredabilidad de 0.7 para altura y de 0.3 para IMC (28). Las variantes de altura que mostraban un desequilibrio de ligamiento menor (LD), se encontraron enriquecidas para heredabilidad, implicando que dichas variantes son una fuente importante de la heredabilidad perdida (28). Sin embargo, para el IMC la heredabilidad estimada por WGS no alcanza lo estimado en estudios de genealogía (0.4 - 0.6) (29), lo cual podría reflejarse en que variantes con MAF <0.01% fueron excluidas del estudio así como la falta de integración de variantes estructurales (28).

Estrategias para aumentar la heredabilidad

Muchos estudios argumentan que la falta de explicación de heredabilidad se debe al tamaño de la muestra (30). Por lo tanto, la estrategia más común usada para aumentar la

detección es incrementar el tamaño de muestra. Otros refieren a imperfecciones en la obtención de datos y del fenotipo (12). También se pudiera cambiar el diseño experimental para usar fenotipos más específicos; por ejemplo, en cáncer de mama donde al menos 5 tipos han sido muy bien caracterizados. Nosotros, como otros, creemos que los algoritmos de análisis también son perfectibles (31, 32). En la siguiente sección mostramos una estrategia algorítmica para aumentar la detección de variantes en estudios de GWAS que llamamos *subtipo genotípico*.

Subtipo genotípico

Subtipo genotípico aplicado a variante de predicción de Enfermedad de Crohn (MARCKS)

En la plataforma de GWAS Catalog que es un compendio de resultados de GWAS así como su resumen de estadísticas, están reportadas 6263 publicaciones de estudios de GWAS de los cuales se han identificado 487,213 asociaciones (6). Se considera que una asociación es genómicamente significativa si el valor de probabilidad (p) estimado es menor a 5×10^{-8} (3) Regularmente muchos resultados son descartados debido al tamaño de muestra o estructura de la población, lo que impide que alcance el p adecuado.

En un estudio publicado en el 2022 y derivado de la tesis de doctorado de uno de los autores (33), después de aplicar métodos multivariados para la identificación de marcadores asociados a la enfermedad, identificamos una variante (rs4945943) asociada a la Enfermedad de Crohn (19) usando datos públicos (34). El metaanálisis realizado en el estudio original en 2017 no la detectó porque típicamente se incluyen solo las variantes presentes en todos los estudios, por lo que dicha variante no fue considerada (34). En nuestro análisis, esta variante se mapeó en un región enhancer, que de acuerdo a la herramienta GeneHancer podría estar afectando al gen MARCKS (19). Este gen, codifica para el sustrato de una proteína quinasa C rica en alanina miristoilada y regula la expresión de citosinas en macrófagos (35). Bajo la premisa de que la Enfermedad de Crohn podía estar compuesta de diferentes genotipos y con el fin de determinar la importancia del marcador identificado en el análisis multivariable de datos de GWAS y su posible interacción con otros genes previamente asociados a Crohn, se generaron otros “sub” análisis GWAS estratificando las muestras en base a los genotipos de rs4945943 (AA, AB y BB). El número de casos correspondientes a cada genotipo fueron 251, 1,655, y 2,601. Y el número de controles fue de 397, 3,154, y 5,643 respectivamente (19). La figura 3 muestra un esquema general del diseño de este análisis de subtipo genotípico por el marcador rs4945943.

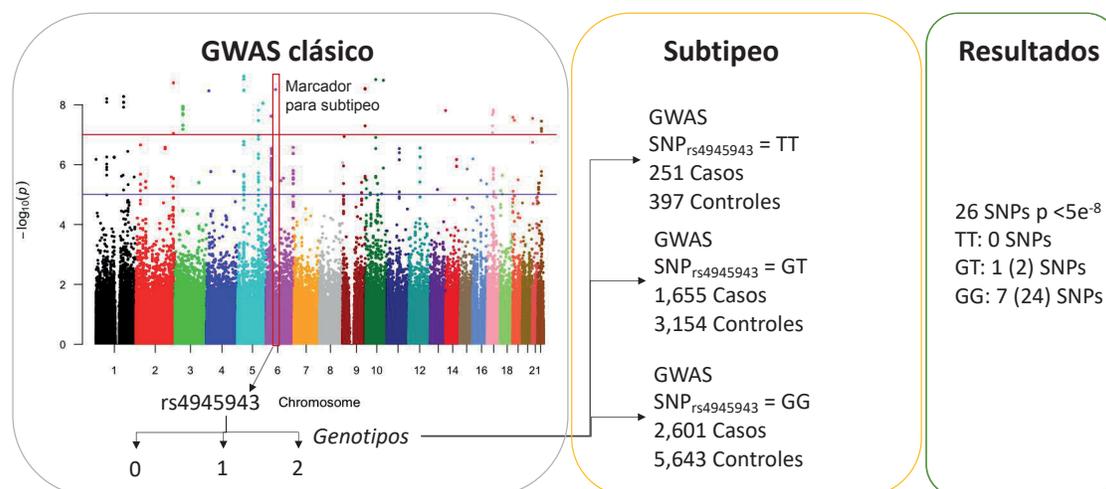


Figura 3. Diseño de análisis para subtipo de población de estudio de la enfermedad de Crohn, acorde al genotipo de la variante rs4945943. SNP principal (número de SNPs totales). Adaptado de lo publicado por Garza y colaboradores en el 2022 (19).

Después de los 3 análisis GWAS, se identificaron 26 asociaciones significativas con $p < 5 \times 10^{-8}$ que no habían sido significativas en el análisis inicial. De las variantes independientes (8 SNPs), las dos ubicadas en los genes ZNF365 y USP25 mostraron una interacción significativa ($p < 0.05$) con el SNP rs4945943 (Tabla II). También se replicaron 35 asociaciones ($p < 5 \times 10^{-8}$) de las cuales 4, en el gen IL23R, mostraban una interacción significativa con el SNP rs4945943. Todos los genes identificados en la estratificación ya habían sido asociados a Crohn previamente (34, 36) pero lo más importante es que no habían sido detectados en el GWAS clásico inicialmente. Por lo tanto, el subtipo genotípico permitió replicar algunos loci que no se habían identificado en una estrategia clásica de GWAS, incluso al disminuir el tamaño de la muestra generado por el subtipo. Esto implica que la partición de muestras en subtipos no es aleatoria, sino que posee una estructura.

(Subtipo genotípico aplicado a consumo de alcohol (ALDH2))

El consumo de alcohol es una característica altamente heredable (14). La proteína Aldehído Deshidrogenasa 2, codificada por el gen ALDH2, metaboliza el alcohol consumido (37) there are variants (i.e., alleles. ALDH2 presenta una variante funcional, rs671 (c.1510G>A [p.Glu504Lys]), involucrada en el consumo de alcohol y presente en ~560 millones de asiáticos (38). Con el objetivo de comprobar la hipótesis que algunas variantes asociadas con el consumo de alcohol podían exhibir una asociación dependiente al genotipo de rs671, un grupo de investigadores japoneses generaron un metaanálisis de GWAS *estratificando* para el genotipo de rs671 en 40,679 individuos (20). La estratificación realizada por este grupo de investigación es equivalente al *subtipo genotípico* explicado previamente. Los autores identificaron

Tabla II. Resultados de subtipo genotípico para variante rs4945943, en la enfermedad de Crohn. El # SNPs refiere a los SNPs en desequilibrio de ligamiento.

SNP PRINCIPAL	# SNPS	GEN	SIN SUBTIPO	RS4945943	SUBTIPO	P INTERACCIÓN
rs11742570	10	PTGER4	6.9×10^{-8}	GG	2.5×10^{-11}	0.81
rs2066845	2	NOD2	1.4×10^{-7}	GT	1.0×10^{-9}	0.20
rs924080	2	IL12RB2	2.1×10^{-3}	GG	1.4×10^{-10}	0.08
rs1420872	3	CYLD	5.2×10^{-6}	GG	1.6×10^{-10}	0.14
rs1736148	5	USP25	7.4×10^{-4}	GG	7.1×10^{-9}	0.01
rs1000141	1	SAG	4.1×10^{-5}	GG	5.6×10^{-11}	0.33
rs4921227	1	IL12B	6.1×10^{-5}	GG	3.5×10^{-8}	0.17
rs10761659	2	ZNF365	6.5×10^{-4}	GG	6.8×10^{-9}	0.02

6 loci (ADH1B, ALDH1B1, ALDH1A1, ALDH2, GOT2, y MYOM1-MYL12A) en la estratificación heterocigota, de los cuales ALDH1B1, GOT2, y MYOM1-MYL12A no habían sido identificados en ningún GWAS anterior (Tabla III). Además ADH1B and ALDH1B1 mostraron una interacción significativa con rs671 (20). Aunque los genes encontrados en la estratificación nunca habían sido relacionados con consumo de alcohol por GWAS, la función biológica de estos da alta esperanza que las asociaciones sean genuinas.

Conclusiones

Subtipo genotípico como herramienta prometedora

Los datos de GWAS siguen siendo una herramienta muy

importante para la identificación de variantes asociadas a enfermedades. Es necesario poder aplicar estrategias que permitan replicar resultados de GWAS y que puedan sobreponerse al efecto de las pruebas múltiples y el tamaño de muestra. El subtipo genotípico podría ser útil para detectar locis cuyos efectos no pudieron identificarse en estudios de GWAS convencionales.

Trabajo futuro sistematizado y aplicado a diversas enfermedades

Es necesaria la aplicación de esta metodología en diferentes bases de datos de GWAS generados para enfermedades complejas de distinto trasfondo genético. Se propone aplicar el subtipo genotípico siguiendo una metodología sistemática para diferentes bases de datos.

Tabla III. Resultados de subtipo genotípico para variante rs671 para consumo de alcohol y publicado por Koyanagui et al. (20).

VARIANTE	GEN	SIN SUBTIPO	RS671	SUBTIPO	P INTERACCIÓN
rs1813977	LOC100507053	1.8e ⁻¹³	GA	6.9e ⁻²⁷	6.2e ⁻¹⁰
rs10005290	ADH1B	3.0e ⁻¹³	GA	5.0e ⁻²⁷	8.9e ⁻¹⁰
rs1229984	ADH1B	1.1e ⁻¹⁷	GA	3.4e ⁻²⁶	2.5e ⁻⁷
rs2228093	ALDH1B1	3.0e⁻⁵	GA	7.2e⁻¹⁴	1.2e⁻⁹
rs8187929	ALDH1A1	1.1e⁻⁴	GA	1.2e⁻¹⁰	2.0e⁻⁵
rs56884502	ALDH2	2.4e ⁻⁵³	GA	3.1e ⁻¹⁰	1.0e ⁻⁶
rs671	ALDH2	9.8e ⁻¹⁵²⁴	-	-	-
rs73550818	GOT2	2.5e⁻²	GA	4.1e⁻⁹	2.5e⁻⁶
rs572435541	MYOM1/MYL12A	2.8e⁻²	GA	2.4e⁻⁸	0.02

Referencias

- Uffelmann, E., Huang, Q. Q., Munung, N. S., de Vries, J., Okada, Y., Martin, A. R., Martin, H. C., Lappalainen, T., and Posthuma, D. (2021) Genome-wide association studies. *Nat. Rev. Methods Prim.* 2021 11. 1, 1–21
- Tam, V., Patel, N., Turcotte, M., Bossé, Y., Paré, G., and Meyre, D. (2019) Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* 2019 208. 20, 467–484
- Risch, N., and Merikangas, K. (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science (80-)*. 273, 1516–1517
- Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S. R., and Lander, E. S. (2012) The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1193–1198
- Sul, J. H., Martin, L. S., and Eskin, E. (2018) Population structure in genetic studies: Confounding factors and mixed models. *PLOS Genet.* 14, e1007309
- Sollis, E., Mosaku, A., Abid, A., Buniello, A., Cerezo, M., Gil, L., Groza, T., Güneş, O., Hall, P., Hayhurst, J., Ibrahim, A., Ji, Y., John, S., Lewis, E., MacArthur, J. A. L., McMahon, A., Osumi-Sutherland, D., Panoutsopoulou, K., Pendlington, Z., Ramachandran, S., Stefancsik, R., Stewart, J., Whetzel, P., Wilson, R., Hindorff, L., Cunningham, F., Lambert, S. A., Inouye, M., Parkinson, H., and Harris, L. W. (2023) The NHGRI-EBI GWAS Catalog: knowledgebase and deposition resource. *Nucleic Acids Res.* 51, D977–D985
- Mitchell, K. J. (2012) What is complex about complex disorders? *Genome Biol.* 13, 237
- Pranavchand, R., and Reddy, B. M. (2016) Genomics era and complex disorders: Implications of GWAS with special reference to coronary artery disease, type 2 diabetes mellitus, and cancers. *J. Postgrad. Med.* 62, 188
- Cai, L., Wheeler, E., Kerrison, N. D., Luan, J., Deloukas, P., Franks, P. W., Amiano, P., Ardanaz, E., Bonet, C., Fagherazzi, G., Groop, L. C., Kaaks, R., Huerta, J. M., Masala, G., Nilsson, P. M., Overvad, K., Pala, V., Panico, S., Rodriguez-Barranco, M., Rolandsson, O., Sacerdote, C., Schulze, M. B., Spijkerman, A. M. W., Tjonneland, A., Tumino, R., van der Schouw, Y. T., Sharp, S. J., Forouhi, N. G., Riboli, E., McCarthy, M. I., Barroso, I., Langenberg, C., and Wareham, N. J. (2020) Genome-wide association analysis of type 2 diabetes in the EPIC-InterAct study.

Sci. Data 2020 7:1, 1–6

10. Yengo, L., Vedantam, S., Marouli, E., Sidorenko, J., Bartell, E., Sakaue, S., Graff, M., Eliassen, A. U., Jiang, Y., Raghavan, S., Miao, J., Arias, J. D., Graham, S. E., Mukamel, R. E., Spracklen, C. N., Yin, X., Chen, S. H., Ferreira, T., Highland, H. H., ..., and Hirschhorn, J. N. (2022) A saturated map of common genetic variants associated with human height. *Nat.* 2022 6107933. **610**, 704–712
11. López-Cortegano, E., and Caballero, A. (2019) Inferring the Nature of Missing Heritability in Human Traits Using Data from the GWAS Catalog. *Genetics*. **212**, 891
12. Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorf, L. A., Hunter, D. J., McCarthy, M. I., Ramos, E. M., Cardon, L. R., Chakravarti, A., Cho, J. H., Guttmacher, A. E., Kong, A., Kruglyak, L., Mardis, E., Rotimi, C. N., Slatkin, M., Valle, D., Whittemore, A. S., Boehnke, M., Clark, A. G., Eichler, E. E., Gibson, G., Haines, J. L., MacKay, T. F. C., McCarroll, S. A., and Visscher, P. M. (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. **461**, 747
13. Gordon, H., Moller, F. T., Andersen, V., and Harbord, M. (2015) Heritability in Inflammatory Bowel Disease: From the First Twin Study to Genome-Wide Association Studies. *Inflamm Bowel Dis*. **21**, 1428–1434
14. Friedel, E., Kaminski, J., and Ripke, S. (2021) Heritability of Alcohol Use Disorder: Evidence from Twin Studies and Genome-Wide Association Studies. *Textb. Addict. Treat.* 10.1007/978-3-030-36391-8_3
15. Maller, J., George, S., Purcell, S., Fagerness, J., Altshuler, D., Daly, M. J., and Seddon, J. M. (2006) Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* **38**, 1055–1059
16. Harley, J. B., Alarcón-Riquelme, M. E., Criswell, L. A., Jacob, C. O., Kimberly, R. P., Moser, K. L., Tsao, B. P., Vyse, T. J., Langefeld, C. D., Nath, S. K., Guthridge, J. M., Cobb, B. L., Mirel, D. B., Marion, M. C., Williams, A. H., Divers, J., Wang, W., Frank, S. G., Namjou, B., Gabriel, S. B., Lee, A. T., Gregersen, P. K., Behrens, T. W., Taylor, K. E., Fernando, M., Zidovetzki, R., Gaffney, P. M., Edberg, J. C., Rioux, J. D., Ojwang, J. O., James, J. A., Merrill, J. T., Gilkeson, G. S., Seldin, M. F., Yin, H., Baechler, E. C., Li, Q. Z., Wakeland, E. K., Bruner, G. R., Kaufman, K. M., and Kelly, J. A. (2008) Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat. Genet.* **40**, 204
17. Willemsen, G., Ward, K. J., Bell, C. G., Christensen, K., Bowden, J., Dalgård, C., Harris, J. R., Kaprio, J., Lyle, R., Magnusson, P. K. E., Mather, K. A., Ordoñana, J. R., Perez-Riquelme, F., Pedersen, N. L., Pietiläinen, K. H., Sachdev, P. S., Boomsma, D. I., and Spector, T. (2015) The Concordance and Heritability of Type 2 Diabetes in 34,166 Twin Pairs From International Twin Registers: The Discordant Twin (DISCOTWIN) Consortium. *Twin Res. Hum. Genet.* **18**, 762–771
18. Polubriaginof, F. C. G., Vanguri, R., Quinnes, K., Belbin, G. M., Yahi, A., Salmasian, H., Lorberbaum, T., Nwankwo, V., Li, L., Shervey, M. M., Glowe, P., Ionita-Laza, I., Simmerling, M., Hripscak, G., Bakken, S., Goldstein, D., Kiryluk, K., Kenny, E. E., Dudley, J., Vawdrey, D. K., and Tatonetti, N. P. (2018) Disease Heritability Inferred from Familial Relationships Reported in Medical Records. *Cell*. **173**, 1692-1704.e11
19. Garza-Hernandez, D., Estrada, K., and Trevino, V. (2022) Multivariate genome-wide association study models to improve prediction of Crohn's disease risk and identification of potential novel variants. *Comput. Biol. Med.* **145**, 105398
20. Koyanagi, Y. N., Nakatochi, M., Ito, H., Kasugai, Y., Narita, A., Kawaguchi, T., Ikezaki, H., Hishida, A., Hara, M., Takezaki, T., Koyama, T., Mikami, H., Suzuki, S., Katsuura-Kamano, S., Kuriki, K., Nakamura, Y., Takeuchi, K., Hozawa, A., Kinoshita, K., Sutoh, Y., Tanno, K., Shimizu, A., Oze, I., Kawakatsu, Y., Taniyama, Y., Imoto, I., Tabara, Y., Takahashi, M., Setoh, K., Suzuki, S., Goto, A., Katagiri, R., Yamaji, T., Sawada, N., Tsugane, S., Wakai, K., Yamamoto, M., Sasaki, M., Matsuda, F., Iwasaki, M., Brennan, P., and Matsuo, K. (2021) Genotype-stratified GWAS meta-analysis reveals novel loci associated with alcohol consumption. *medRxiv*. 10.1101/2021.06.02.21258094
21. Barry, C.-J. S., Walker, V. M., Cheesman, R., Davey Smith, G., Morris, T. T., and Davies, N. M. (2022) How to estimate heritability: a guide for genetic epidemiologists. *Int. J. Epidemiol.* 10.1093/IJE/DYAC224
22. Roden, M., and Shulman, G. I. (2019) The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*. **576**, 51–60
23. Vujkovic, M., Keaton, J. M., Lynch, J. A., Miller, D. R., Zhou, J., Tcheandjieu, C., Huffman, J. E., Assimes, T. L., Lorenz, K., Zhu, X., Hilliard, A. T., Judy, R. L., Huang, J., Lee, K. M., Klarin, D., Pyarajan, S., Danesh, J., Melander, O., Rasheed, A., ..., and Saleheen, D. (2020) Discovery of 318 new risk loci for type 2 diabetes and related vascular outcomes among 1.4 million participants in a multi-ethnic meta-analysis. *Nat. Genet.* **52**, 680
24. Modi, P., and Cascella, M. (2022) Diffusing Capacity Of The Lungs For Carbon Monoxide. *StatPearls*
25. Ghio, A. J., Crapo, R. O., Elliott, C. G., Adams, T. D., Hunt, S. C., Jensen, R. L., Fisher, A. G., and Afman, G. H. (1989) Heritability estimates of pulmonary function. *Chest*. **96**, 743–746
26. Terzikhan, N., Sun, F., Verhamme, F. M., Adams, H. H. H., Loth, D., Bracke, K. R., Stricker, B. H. C., Lahousse, L., Dupuis, J., Brusselle, G. G., and O'Connor, G. T. (2018) Heritability and genome-wide association study of diffusing capacity of the lung. *Eur. Respir. J.* **52**, 1800647
27. Eichler, E. E., Flint, J., Gibson, G., Kong, A., Leal, S. M., Moore, J. H., and Nadeau, J. H. (2010) Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat. Rev. Genet.* 2010 116. **11**, 446–450
28. Wainschtein, P., Jain, D., Zheng, Z., Aslibekyan, S., Becker, D., Bi, W., Brody, J., Carlson, J. C., Correa, A., Du, M. M., Fernandez-Rhodes, L., Ferrier, K. R., Graff, M., Guo, X., He, J., Heard-Costa, N. L., Highland, H. M., Hirschhorn, J. N., Howard-Claudio, C. M., ..., and Visscher, P. M. (2022) Assessing the contribution of rare variants to complex trait heritability from whole-genome sequence data. *Nat. Genet.* 2022 543. **54**, 263–273
29. Elks, C. E., Hoed, M. den, Zhao, J. H., Sharp, S. J., Wareham, N. J., Loos, R. J. F., and Ong, K. K. (2012) Variability in the heritability of body mass index: A systematic review and meta-regression. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **3**, 29
30. Young, A. I. (2019) Solving the missing heritability problem. *PLOS Genet.* **15**, e1008222

31. Nolte, I. M., Van Der Most, P. J., Alizadeh, B. Z., De Bakker, P. I. W., Boezen, H. M., Bruinenberg, M., Franke, L., Van Der Harst, P., Navis, G., Postma, D. S., Rots, M. G., Stolk, R. P., Swertz, M. A., Wolffenbuttel, B. H., Wijmenga, C., and Snieder, H. (2017) Missing heritability: is the gap closing? An analysis of 32 complex traits in the Lifelines Cohort Study. *Eur. J. Hum. Genet.* 2017 257. **25**, 877–885
32. Shirali, M., Knott, S. A., Pong-Wong, R., Navarro, P., and Haley, C. S. (2018) Haplotype Heritability Mapping Method Uncovers Missing Heritability of Complex Traits. *Sci. Reports* 2018 81. **8**, 1–9
33. Garza Hernández, D. (2022) *Feature selection from biological bigdata: identification of significant associations applying multivariate machine learning algorithms to genome-wide association studies (GWAS)*. Ph.D. thesis, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.105398>
34. de Lange, K. M., Moutsianas, L., Lee, J. C., Lamb, C. A., Luo, Y., Kennedy, N. A., Jostins, L., Rice, D. L., Gutierrez-Achury, J., Ji, S.-G., Heap, G., Nimmo, E. R., Edwards, C., Henderson, P., Mowat, C., Sanderson, J., Satsangi, J., Simmons, A., Wilson, D. C., Tremelling, M., Hart, A., Mathew, C. G., Newman, W. G., Parkes, M., Lees, C. W., Uhlig, H., Hawkey, C., Prescott, N. J., Ahmad, T., Mansfield, J. C., Anderson, C. A., and Barrett, J. C. (2017) Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* **49**, 256–261
35. Lee, S. M., Suk, K., and Lee, W. H. (2015) Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) regulates the expression of proinflammatory cytokines in macrophages through activation of p38/JNK MAPK and NF- κ B. *Cell. Immunol.* **296**, 115–121
36. Liu, J. Z., Van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S. C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J. C., Jostins, L., Shah, T., Abedian, S., Cheon, J. H., Cho, J., Daryani, N. E., Franke, L., Fuyuno, Y., Hart, A., Juyal, R. C., Juyal, G., Kim, W. H., Morris, A. P., Poustchi, H., Newman, W. G., Midha, V., Orchard, T. R., Vahedi, H., Sood, A., Sung, J. J. Y., Malekzadeh, R., Westra, H. J., Yamazaki, K., Yang, S. K., Barrett, J. C., Franke, A., Alizadeh, B. Z., Parkes, M., Thelma, B. K., Daly, M. J., Kubo, M., Anderson, C. A., and Weersma, R. K. (2015) Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat. Genet.* **47**, 979–986
37. Edenberg, H. J. (2007) The Genetics of Alcohol Metabolism: Role of Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Variants. *Alcohol Res. Heal.* **30**, 5
38. Chen, C. H., Ferreira, J. C. B., Gross, E. R., and Mochly-Rosen, D. (2014) Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol. Rev.* **94**, 1–34
-



DR. VÍCTOR MANUEL TREVIÑO ALVARADO
ORCID: 0000-0002-7472-9844

Profesor-Investigador en biología computacional, bioinformática y bioestadística del Tecnológico de Monterrey. El Dr. Víctor Manuel Treviño Alvarado inició sus estudios especializados como Técnico en Procesamiento de Datos en lo que fue la Escuela de Técnicos del Tec de Monterrey graduándose en 1989. Continuó sus estudios profesionales como Ingeniero en Sistemas Electrónicos en 1994 en el Tec y prosiguió con una Maestría en Ciencias en Biología Molecular e Ingeniería Genética en la Facultad de Medicina de la UANL. en 1999 donde obtuvo mención honorífica. Culminó en 2007 estudios doctorales en la University of Birmingham de Inglaterra. Trabajó en desarrollo de software para la industria, la administración de empresas, la educación a distancia, y ahora para investigación por más de 15 años. Inició labores en el Tecnológico de Monterrey en 1999 y a partir del 2007 es profesor-investigador en el área de bioinformática impartiendo clases de ingeniería, computación, biotecnología, y medicina tanto a nivel pregrado como en posgrado. Ha dirigido la cátedra de investigación en bioinformática desde el 2009. Ha graduado y dirigido a 7 doctores y 17 alumnos de maestría. Es miembro activo del Sistema Nacional de Investigadores de CONACyT desde el 2007 y actualmente es S.N.I. nivel 3. Desde 2008 y hasta 2022 dirigió el Grupo de Investigación en Bioinformática en la Escuela de Medicina e Ingeniería del Tec de MTy. Ha publicado más de 80 artículos de investigación acumulando más de 5500 citas. Actualmente es Director Científico de oriGen, proyecto de investigación genómica de 100,000 Mexicanos.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 68-80

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Perspectiva inmunológica en la estratificación del riesgo de parto pretérmino en mujeres saludables.

Immunological perspective in the stratification of preterm risk of delivery in healthy women.

Sandoval-Colin, Daniel Eduardo¹; Meraz-Cruz, Noemí²; Ramírez-Velázquez, Norma Lilia²
y Vadillo-Ortega Felipe².

¹Unidad de Vinculación Científica de la Facultad de Medicina y Plan de Estudios Combinados en Medicina, UNAM en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México.

²Unidad de Vinculación Científica, Facultad de Medicina, UNAM en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México.

*Correspondencia. Unidad de Vinculación Científica, Facultad de Medicina, UNAM en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, C.P. 14610, CDMX, (México), Tel: +52 (55) 8816-5359 ext. 1200, d.eduardo.sandoval@comunidad.unam.mx

Resumen

Los procesos inflamatorios asociados con el parto humano aún no se comprenden completamente, no solo porque la brecha entre la inflamación y el inicio del parto ha sido difícil de estudiar, también debido a las dificultades en las metodologías de análisis y al conocimiento limitado sobre el papel de las citocinas durante el embarazo y el parto en el contexto clínico. El objetivo de este estudio es mostrar, a manera de ejemplo, potenciales herramientas de análisis para evaluar el riesgo de un evento (parto pretérmino) utilizando marcadores inmunológicos (citocinas) que poseen cierta complejidad para su aplicación clínica. Se utilizaron los datos de la cohorte prospectiva de mujeres embarazadas de la Ciudad de México: “Pregnancy Research on Inflammation, Nutrition & City Environment: Systematic Analyses”, esta cuenta con mediciones longitudinales de 18 citocinas en exudado cervicovaginal a lo largo del embarazo, además de variables clínicas y demográficas, donde su desenlace principal es la semana de gestación del parto. Aquí, mostramos que el pre-procesamiento de los datos es una característica crucial para

Abstract

The inflammatory processes associated with human parturition are not fully understood, not only because the gap between inflammation and the onset of labor has been difficult to study, but also due to difficulties in analysis methodologies and limited knowledge about the role of cytokines during pregnancy and childbirth in the clinical context. The objective of this study is to demonstrate, as an example, potential analysis tools to assess the risk of an event (preterm labor) using immunological markers (cytokines) that have some complexity for their clinical application. Data from the prospective cohort of pregnant women in Mexico City: “Pregnancy Research on Inflammation, Nutrition & City Environment: Systematic Analyses”, were used. This cohort includes longitudinal measurements of 18 cytokines in cervicovaginal fluid throughout pregnancy, as well as clinical and demographic variables, where the main outcome is the week of gestation at delivery. Here, we show that data preprocessing is a crucial feature for adjusting statistical models, such as variable transformation and missing data

el ajuste de modelos estadísticos, como la transformación de variables y el manejo de datos faltantes. Se abordaron dos perspectivas de análisis, el basado en datos y el basado en hipótesis. Respecto al basado en datos, exploramos la utilidad del análisis de clases latentes para la identificación subgrupos no observables en las trayectorias de las concentraciones de citocinas a lo largo del embarazo. En cuanto al basado en hipótesis, utilizamos el modelo “Joint” para probar la hipótesis sobre que un mayor nivel o una mayor tasa de incremento de las concentraciones de citocinas se asocian con un mayor riesgo de parto pretérmino. Ambos enfoques se complementan para una mejor descripción del fenómeno y nos ayudan a la toma de decisiones, a postular teorías o a continuar con otras estrategias de análisis.

Palabras clave: análisis, citocinas, estudio longitudinal, modelo Joint, parto pretérmino.

management. Two perspectives of analysis were addressed, data-driven and hypothesis-driven. Regarding the data-driven perspective, we explored the usefulness of latent class analysis for identifying non-observable subgroups in cytokine concentration trajectories throughout pregnancy. Regarding the hypothesis-based perspective, we used the “Joint” model to test the hypothesis that a higher level or a higher rate of increase in cytokine concentrations is associated with a higher risk of preterm delivery. Both approaches complement each other for a better description of the phenomenon and help us in decision-making, postulating theories, or continuing with other analysis strategies.

Keywords: analysis, cytokines, longitudinal study, Joint model, preterm birth.

Introducción

El parto humano es un ejemplo particular que pone en evidencia la importancia del estudio y comprensión de los procesos inmunológicos, pues se trata de un proceso único de nuestra especie (1), donde los mecanismos que lo regulan y lo inician, aún no se comprenden completamente. Durante el embarazo y el parto se incluye una amplia red de vías biológicas con señalización endocrina y paracrina, con la importante participación de la respuesta inmune innata (2). Debido a cuestiones éticas y metodológicas es que se ha limitado la exploración de los mecanismos que vinculan la respuesta inflamatoria intrauterina con los eventos del parto humano, ya sea normal o pretérmino. Para superar estas dificultades, se ha propuesto la evaluación de compartimentos como el exudado cervicovaginal (ECV) (3), que ha generado evidencia de su utilidad como un subrogado menos invasivo para estudiar la dinámica de la respuesta inflamatoria intrauterina asociada con la progresión del embarazo y del parto normal (≥ 37 y < 42 semanas de gestación, SDG) o pretérmino (< 37 SDG) (4).

Actualmente, el incremento en la disponibilidad de nuevas tecnologías de cuantificación de proteínas y de metodologías de análisis ha llevado al desarrollo de prácticas de medicina basada en datos a través de la utilización de medidas altamente detalladas, longitudinales y multiparamétricas de los determinantes de la salud. Lo que ha permitido modificar factores de riesgo de enfermedades, detectar procesos tempranos de enfermedades, impulsar intervenciones precisas y ajustadas dinámicamente, y determinar la eficacia de intervenciones preventivas y terapéuticas a partir de los resultados del mundo real. Por el contrario, las pruebas médicas actuales a menudo se basan en instantáneas demasiado generales, estáticas y, frecuentemente, aisladas del estado de salud de un individuo, tomadas con meses o incluso años de diferencia (5).

La perspectiva basada en datos complementa la exploración de nuevos campos en la investigación médica y posibilita la generación de nuevas hipótesis. También, orienta a la posible respuesta de una pregunta difícil de someter a una prueba de hipótesis. Además, de ayudar en la estratificación de poblaciones debido la gran heterogeneidad de muchos procesos fisiopatológicos con múltiples y potenciales factores causales. La vinculación de ambos enfoques forma parte de las bases de la medicina de alta definición (5), la cual se basa en la evaluación precisa y completa a nivel individual de los determinantes de la salud. Así, los riesgos e intervenciones para la salud se adaptan y evalúan en relación al estado basal individual; comparándose con sí mismo y con otros individuos similares y no con las reglas o estándares generales de la población.

De esta manera, el propósito de este estudio es mostrar, a manera de ejemplo y en una población aparentemente saludable, la aplicación de este paradigma a través de potenciales herramientas de análisis para evaluar y estratificar el riesgo de un evento (parto pretérmino) utilizando marcadores inmunológicos (citocinas) que poseen cierta complejidad para su aplicación clínica.

Método

La base de datos que utilizamos pertenece a la cohorte prospectiva de mujeres embarazadas de la Ciudad de México (6-7): “Pregnancy Research on Inflammation, Nutrition & City Environment: Systematic Analyses (PRINCESA)”. Desde febrero de 2009 hasta noviembre de 2014, se reclutaron 935 mujeres embarazadas que residían en diversas regiones del área metropolitana de la Ciudad de México en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), y en las clínicas y hospitales de salud pública de la Secretaría de Salud de la Ciudad de México (SEDESA). La aprobación de los sujetos humanos para el estudio se obtuvo del Comité

de Revisión Institucional de la Universidad de Michigan y de los Comités de Investigación y Ética en sujetos humanos de las instituciones mexicanas participantes. La información detallada sobre los criterios de selección y recolección de datos se encuentra disponible en otras publicaciones (6-7).

Por practicidad y para ilustrar la metodología de análisis planteada se utilizaron las siguientes variables clínicas: edad, índice de masa corporal (IMC) pregestacional, semana de gestación (SDG) del parto/nacimiento, SDG por visita, número de embarazos previos, intervalo en semanas de la visita al parto, desenlace del parto y el antecedente de nacimiento pretérmino previo.

Análisis estadístico

Manejo de datos faltantes en el contexto de cuantificación de citocinas

En esta cohorte se estudiaron citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria relacionada al parto, que incluyeron citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias, quimiocinas y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). Todas ellas se cuantificaron en muestras de ECV a través de un sistema multiplex personalizado *Milliplex Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel and the MAGPIX Reader*; Millipore, Burlington, MA, EE. UU. Para fines de este escrito solo se analizaron cuatro de dieciocho citocinas disponibles: interleucina-1 alfa (IL-1a), interleucina-2 (IL-2), receptor antagonista de interleucina-1 (IL-1Ra) y el VEGF.

Los datos recopilados de este instrumento de cuantificación tienen ciertas características que son típicas de los datos de expresión de citocinas, que generalmente hacen que el análisis estadístico sea un desafío (8). Los datos frecuentemente no se distribuyen de manera simétrica o normal y por lo general no se transforman en una distribución en la que se pueden aplicar pruebas paramétricas. Además, nos encontramos con datos que se encuentran por debajo o por arriba de los límites de detección del rango dinámico, o en otras palabras, datos con censura izquierda o derecha, respectivamente (9).

La literatura recomienda diferentes métodos para tratar con datos censurados o “no detectables”. Estas sugerencias comprenden la sustitución de los valores por encima o por debajo del nivel de detección como la regresión Tobit, la imputación múltiple y la eliminación, entre otras (10). Sin embargo, la sustitución simple no es aconsejable, ya que puede conducir a resultados fuertemente sesgados. Otros métodos, como la regresión de Tobit, requieren sólidas suposiciones paramétricas que rara vez pueden cumplirse con datos de citocinas (11). Se ha demostrado que la imputación múltiple es válida (12), pero consume bastante tiempo, especialmente cuando los conjuntos de datos son grandes. Además, las relaciones complejas presentes entre y dentro de los parámetros inmunológicos y epidemiológicos deben tenerse en cuenta mediante modelos estadísticos apropiados

para evitar confusiones y revelar efectos de interacción. Por lo tanto, es importante utilizar herramientas estadísticas que i) tengan en cuenta la censura, ii) no sean propensas a violar los supuestos paramétricos y iii) permitan el ajuste de covariables, posibles efectos de confusión e interacción.

A continuación se presenta los métodos más importantes que se consideraron para la imputación de los datos con censura izquierda, seguido de una descripción del método implementado.

El primer modelo considerado fue el de Tobit. Desarrollado por James Tobin (13), como una modificación de la distribución logit, hace uso de regresión logística para probar una hipótesis y trunca la variable dependiente para los datos sin medición. Sin embargo, solo sirve para cuando hay una acumulación de valores que tiende al límite de detección. No es el caso de los datos obtenidos, pues estos pueden estar muy fuera del rango y lejos del límite de detección. Además, la variable censurada en nuestro caso es la independiente.

Otra técnica considerada fue la de Kaplan-Meier (14), la cual permite construir una función de distribución acumulada usando datos censurados. El problema de este método es que asume que los datos censurados están distribuidos aleatoriamente a través de todo el rango. Los datos censurados en los extremos contribuyen lo mismo que en una función de distribución acumulada sin ajustar.

Si la distribución empírica se parece a una distribución conocida, se pueden simular los datos faltantes. Sin embargo, ajustar los datos a una distribución sin truncar haría que las colas sean más cortas de lo que en realidad son. Tal dificultad se puede sobrellevar ajustando los datos a una distribución truncada, lo cual se hace con ligeros cambios a la fórmula matemática de la distribución y utilizando algoritmos de optimización para ajustarse a la nueva fórmula.

Por lo tanto, para abordar el problema de censura izquierda de este proyecto utilizamos un método de imputación con distribuciones truncadas. Cuando la distribución de los datos a analizar tiene un límite de detección, se presenta una interrupción abrupta en esta. De esta manera, si se quiere ajustar una curva a estos datos, se deben de hacer ajustes a las fórmulas de la función densidad de probabilidad y de la función de densidad acumulada, para así estimar y ajustar los datos censurados a estas curvas usando, por ejemplo, el método de estimación por máxima verosimilitud. Como se encuentra truncada la distribución, esta se debe normalizar para recuperar el rango truncado o asumir una distribución de probabilidad perteneciente a la familia de la distribución exponencial.

Debido a la naturaleza longitudinal de los datos y a las acentuadas variaciones en las concentraciones de citocinas, es difícil ajustar los datos a una distribución conocida, principalmente cuando se estratifican por la variable dependiente de interés (parto a término vs parto pretérmino). En estos casos se pueden implementar métodos no paramétricos, en particular los derivados de los rangos logarítmicos. El uso de rangos permite que los valores

censurados se asignen a un rango empatado, manteniendo así la información cualitativa que brindan. De esta manera, se pueden obtener diferencias entre los grupos que toman en cuenta los valores censurados. En este estudio, la distribución de probabilidad que mejor se ajustó fue la gamma, y se utilizó el estadístico de Mann-Whitney para encontrar los periodos en los que las citocinas tuvieran mayores diferencias entre las distribuciones de los grupos de parto a término y parto pretérmino. Los detalles de la metodología de la imputación se encuentran disponibles en otro sitio (15).

En el caso de la censura derecha, se podría plantear la dilución de la muestra para su posterior cuantificación, sin embargo, esto conlleva a un aumento en los recursos destinados al proyecto y a un retraso de la fase analítica. Por lo tanto, conservar la estimación por el instrumento, a pesar de un mayor error en el valor de cuantificación, puede ser una alternativa viable para reducir costos, aunque no todos los instrumentos de este tipo son capaces de ofrecer estas mediciones.

Transformación de los datos

Actualmente se encuentran disponibles varias funciones para la estimación de transformaciones que se pueden utilizar para normalizar los datos, cada una con sus propias aplicaciones y limitaciones. El objetivo de algunas es “hacer que los datos sean gaussianos”, en lugar de transformarlos a la escala 0-1. Hay muchos casos en los que los investigadores pueden normalizar una variable (16):

- El supuesto de normalidad de la variable dependiente (condicional a las covariables) en el problema de regresión lineal clásico. A lo largo de los años, se han utilizado muchos métodos para relajar este supuesto: modelos lineales generalizados, regresión por cuantiles, modelos de supervivencia, etc. Una técnica que sigue siendo algo popular en este contexto es hacer que los datos parezcan normales a través de algún tipo de transformación de normalización. Esto podría ser algo tan simple como una transformación logarítmica o algo tan complejo como una transformación de Yeo-Johnson (17).
- Otra aplicación cada vez más popular de la normalización ocurre en entornos de regresión aplicada con distribuciones altamente sesgadas de las covariables. En estos entornos, existe la tendencia a tener puntos de alto apalancamiento (y puntos de gran influencia), incluso cuando uno centra y escala las covariables (18). La normalización de las covariables mitiga el apalancamiento y la influencia de estas covariables, lo que permite una selección de modelos más sencilla.
- Una desventaja de la regresión con transformación de ambos lados es la dificultad de interpretar las estimaciones en la escala original. A veces, el uso de un modelo lineal generalizado especial puede

permitir un buen ajuste sin transformar la variable dependiente.

En este escrito se hará especial mención de un paquete de R llamado “bestNormalize” que fue diseñado para ayudar a encontrar de manera consistente y precisa una transformación de normalización para un vector. Hay muchas técnicas que se han desarrollado con este objetivo, sin embargo, cada una ha estado sujeta a sus propias fortalezas y debilidades, y no está claro cómo decidir cuál funcionará mejor hasta que se observen los datos. Este paquete busca una variedad de transformaciones posibles y devolverá la mejor, es decir, la que hace que se vea más normal (19-20).

El paquete implementa la transformación de Box-Cox (21), la transformación de Yeo-Johnson (17), tres tipos de transformaciones de Lambert WxF (22) y la transformación de normalización de cuantiles ordenados (19). Además, estima la eficacia de normalización de otras transformaciones de uso común y permite a los usuarios especificar transformaciones personalizadas o estadísticas de la normalización.

Para este proyecto se realizó una transformación logarítmica debido a que la mayoría de las citocinas se ajustaron a una distribución gamma para poder realizar el proceso de imputación. Además, se decidió mantener esta transformación con fines de facilitar la interpretabilidad de los modelos ajustados y la potencial aplicación de ellos en el contexto de la práctica clínica.

Análisis de clases latentes

El modelo lineal mixto se ha convertido en un método estadístico estándar para analizar el cambio en el tiempo de una variable dependiente gaussiana longitudinal y evaluar el efecto de las covariables en él. Sin embargo, los datos longitudinales recopilados en estudios de cohortes pueden ser demasiado complejos para entrar en el marco del modelo (23). Este asume que la población de N sujetos es homogénea y se describe a nivel de la población para un perfil único. En cambio, el modelo mixto de clases latentes consiste en suponer que la población es heterogénea y está compuesta por G clases latentes de sujetos caracterizados por G perfiles promedios de trayectorias. Cada sujeto pertenece a una y solo una clase latente, por lo que la pertenencia a la clase latente se define mediante una variable aleatoria discreta c_i que es igual a g si el sujeto i pertenece a la clase latente g ($g = 1, \dots, G$). La variable c_i es latente; su probabilidad se describe mediante un modelo logístico multinomial según sus covariables Xc_i . El método de máxima verosimilitud nos permite realizar estimaciones para formar subgrupos que son internamente homogéneos y externamente heterogéneos (24). En resumen, el análisis de clases latentes (LCA, por sus siglas en inglés) es una forma de descubrir agrupaciones ocultas (no-observadas) en una población de estudio.

Para el LCA de este proyecto se implementó el paquete de R “lcmm” (24). De manera inicial, se tomó todo el

conjunto de datos sin contemplar el desenlace del parto (término vs pretérmino), para evaluar la presencia de grupos en las trayectorias de las concentraciones de citocinas. Posteriormente, el análisis solo se limitó a las mujeres con un desenlace de parto/nacimiento a término, debido a que este conjunto de individuos contaba con variabilidad amplia; esto con el fin de encontrar al subgrupo más homogéneo, es decir, definir una trayectoria menos variable de nuestro grupo de referencia y posibilitar un mejor ajuste de los modelos siguientes.

Los medidas diagnósticas que se utilizaron para evaluar los modelos lineales mixtos fueron la normalidad de los residuos, el coeficiente de determinación (R^2) y la minimización del criterio de información bayesiano (BIC, por sus siglas en inglés). Los predictores se sometieron a pruebas de homocedasticidad y linealidad. La selección de modelos del LCA fue evaluada mediante la minimización del BIC y con la media de probabilidades a posteriori de cada clase $\geq 80\%$.

Modelo Joint

Los modelos Joint para datos longitudinales y de tiempo hasta el evento (o también conocidos como de supervivencia) constituyen un paradigma de modelado atractivo que actualmente goza de gran interés en la literatura médica y estadística (25-26). En muchos entornos de investigación, es muy común capturar observaciones longitudinales que corresponden a medidas continuas junto con indicadores dicotómicos para marcar la ocurrencia de un evento de interés. Un ejemplo prototípico en la investigación clínica es la evaluación repetida de medidas biológicas (p. ej., presión arterial, afinidad de anticuerpos, nivel de colesterol) que pueden relacionarse con un evento como la muerte, la recuperación de una enfermedad o el diagnóstico de una enfermedad. Además, mucho interés gira en torno a la asociación entre las trayectorias de una medida biológica y el evento.

El ajuste de los modelos para este proyecto se llevó a cabo mediante el paquete de R “JMbayes2” (27). Este paquete proporciona un marco en el que una o más características del submodelo longitudinal se pueden parametrizar de manera flexible como predictores lineales en el submodelo de tiempo hasta el evento.

Esta flexibilidad es importante porque la relación entre la variable continua y el evento de interés puede tomar varias formas funcionales, cada una de las cuales puede implicar una interpretación teórica diferente. Por ejemplo, el proceso longitudinal se puede especificar en términos relativamente simples (efectos aleatorios individuales sobre el intercepto y la pendiente lineal dentro del submodelo de efectos mixtos), o en efectos más complejos como *splines* no lineales, cada uno de los cuales se puede vincular al proceso de tiempo hasta el evento con cualquiera de las estructuras de asociación.

JMbayes2 también permite la inclusión de procesos longitudinales multivariados y criterios de estratificación en el submodelo de tiempo hasta el evento. Además, la estimación de modelos conjuntos, que son inherentemente complejos, puede ser computacionalmente demandantes. Por su nombre, el paquete JMbayes2 se basa en un enfoque analítico bayesiano, que es muy atractivo para aplicaciones donde la estimación clásica de máxima verosimilitud a menudo encuentra problemas de no identificabilidad que generan conclusiones inferenciales poco confiables. De hecho, el análisis bayesiano que utiliza la estimación por métodos de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) puede generar estimaciones puntuales muy precisas sin depender de suposiciones asintóticas (28). Estos métodos de simulación generan muestras de las distribuciones a posteriori y estiman cantidades de interés a posteriori. El paquete también proporciona medidas de diagnóstico útiles para evaluar la convergencia de la simulación y para evaluar el ajuste relativo del modelo.

De manera general el modelo Joint estima la estructura de asociación que asume que el riesgo de un evento en cualquier momento t está asociado con el valor subyacente actual del biomarcador en el mismo momento. Esta formulación es la formulación estándar utilizada para las covariables dependientes de tiempo. Sin embargo, se debe enfatizar que esta no es la única opción que se puede ajustar. En general, podría haber otras características de los perfiles longitudinales de los sujetos que son más fuertemente predictivas del riesgo de un evento; por ejemplo, la tasa de aumento/disminución de los niveles del biomarcador o un resumen adecuado de toda la trayectoria longitudinal, entre otros.

Inicialmente se ajustaron los modelos lineales mixtos para modelar la relación entre la concentración de citocina y la SDG de cada visita. Como variable independiente se ajustó la interacción de la SDG de cada visita con la categoría de parto, ajustándose un polinomio cuadrático para los valores de la SDG de cada visita. Tomando en cuenta una estructura longitudinal subyacente se especificaron efectos aleatorios individuales sobre el intercepto y la pendiente lineal.

El modelo de riesgos proporcionales de Cox se ajustó con el evento de parto pretérmino (los partos a término fueron censurados) y con los intervalos de tiempo calculados desde la SDG de la visita hasta la SDG del parto/nacimiento, además ajustándose por la covariable de antecedente de nacimiento pretérmino.

Por último, para el modelo Joint se ajustó una estructura de asociación donde se estimó la formulación estándar y la tasa de aumento/disminución de los niveles de concentración de las citocinas. Además, con fines de resaltar los resultados del LCA aplicado al grupo de partos/nacimientos a término, también se ajustaron modelos Joint utilizando el conjunto de datos de la clase más grande de este grupo, en un intento de homogeneizar esta población.

Resultados*Población de estudio y datos faltantes*

En total se incluyeron 460 sujetos de estudio para el análisis, los cuales contaban con cuantificación completa de citocinas en muestras de ECV, un mínimo de dos visitas durante el seguimiento de su embarazo y registro de la SDG del parto/nacimiento. En la Tabla I, se muestran los estadísticos

descriptivos y la proporción de datos faltantes por censura de toda la muestra, además de estratificarse por grupo de parto pretérmino. En la Tabla II se muestran los estadísticos descriptivos de las citocinas después de realizar la imputación. Si comparamos la Tabla I con la Tabla II podemos observar que las diferencias entre las concentraciones de citocina y la variable dependiente (grupos de parto) difieren para la citocina IL-1 α . Pues antes de la imputación se observa una

Tabla I. Características descriptivas de la cohorte en estudio y proporción de datos faltantes de las citocinas estratificados por grupo de parto.

	Parto en SDG				p-value ²
	General N = 460 n = 2,562 ¹	≥ 37 N = 407 n = 2,327 ¹	34-36 N = 40 n = 193 ¹	<34 N = 13 n = 42 ¹	
Edad, (años)					0.054
Mediana (RIQ)	24.0 (20.0, 30.0)	24.0 (20.0, 30.0)	22.0 (19.0, 29.0)	24.0 (21.0, 30.8)	
Rango	15.0, 42.0	15.0, 42.0	18.0, 33.0	18.0, 36.0	
IMC pregestacional, (kg/m²)					0.003
Mediana (RIQ)	25.2 (21.9, 28.7)	25.3 (22.0, 28.7)	23.9 (21.4, 26.8)	23.6 (21.6, 29.7)	
Rango	15.8, 47.5	15.8, 47.5	19.1, 32.0	16.0, 41.8	
SDG al nacimiento					<0.001
Mediana (RIQ)	39.20 (38.20, 40.10)	39.30 (38.40, 40.10)	35.40 (35.00, 36.30)	32.50 (30.40, 33.40)	
Rango	25.40, 42.60	37.00, 42.60	34.20, 36.60	25.40, 33.50	
SDG por visita					<0.001
Median (IQR)	25 (18, 31)	25 (18, 32)	23 (17, 29)	22 (18, 26)	
Rango	7, 42	7, 42	8, 36	10, 32	
NEP					0.5
Mediana (RIQ)	1.00 (0.00, 2.00)	1.00 (0.00, 2.00)	1.00 (0.00, 2.00)	1.00 (1.00, 1.00)	
Rango	0.00, 6.00	0.00, 6.00	0.00, 3.00	0.00, 3.00	
Intervalo visita-parto, (semanas)					<0.001
Mediana (RIQ)	14 (7, 21)	14 (7, 21)	13 (7, 19)	9 (6, 14)	
Rango	0, 33	0, 33	0, 28	0, 24	
ANPP, n (%)	219 (8.5%)	199 (8.6%)	17 (8.8%)	3 (7.1%)	>0.9
IL-1α, (pg/mL)					0.001

Mediana (RIQ)	1,016 (181, 2,833)	980 (167, 2,773)	1,193 (386, 4,118)	1,701 (1,178, 6,047)	
Rango	10, 10,000	10, 10,000	18, 10,000	152, 10,000	
Datos faltantes, n (%)	328 (12.8)	270 (11.6)	38 (19.7)	20 (47.6)	
IL-2, (pg/mL)					0.11
Mediana (RIQ)	8 (3, 27)	8 (3, 27)	5 (3, 25)	16 (5, 36)	
Rango	1, 3,078	1, 3,078	1, 1,685	2, 1,402	
Datos faltantes, n (%)	521 (20.3)	476 (20.5)	38 (19.7)	7 (16.7)	
IL-1Ra, (pg/mL)					<0.001
Mediana (RIQ)	6,080 (1,928, 10,000)	5,690 (1,575, 10,000)	10,000 (5,965, 10,000)	10,000 (6,728, 10,000)	
Rango	9, 10,000	9, 10,000	14, 10,000	21, 10,000	
Datos faltantes, n (%)	407 (15.9)	384 (16.5)	20 (10.4)	3 (7.1)	
VEGF, (pg/mL)					0.004
Mediana (RIQ)	213 (108, 2,421)	208 (111, 876)	360 (111, 10,000)	248 (84, 10,000)	
Rango	26, 10,000	26, 10,000	26, 10,000	26, 10,000	
Datos faltantes, n (%)	494 (19.3)	473 (20.3)	20 (10.4)	1 (2.4)	

¹n (%)²Kruskal-Wallis rank sum test; Fisher's Exact Test for Count Data with simulated p-value (based on 2000 replicates)

Abreviaturas: N, total de pacientes; n, total de observaciones; RIQ, rango intercuartil; SDG, semana de gestación; IMC, índice de masa corporal; NEP, número de embarazos previos; APP, antecedente de parto pretérmino; IL-1 α , interleucina-1 alfa; IL-2, interleucina-2; IL-1Ra, receptor antagonista de interleucina-1; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular. >37, parto a término; 34-36 y >34, parto pretérmino.

Tabla II. Estadísticos descriptivos de las citocinas de estudio posterior a la imputación estratificados por grupo de parto.

	Parto en SDG				p-value ¹
	General	>=37	34-36	<34	
	N = 460 n = 2,562	N = 407 n = 2,327	N = 40 n = 193	N = 13 n = 42	
IL.1a					0.065
Mediana (RIQ)	685 (43, 2,276)	684 (45, 2,283)	762 (33, 2,141)	293 (4, 1,734)	
Rango	0, 10,000	0, 10,000	0, 10,000	0, 10,000	
IL.2					0.2
Mediana (RIQ)	5 (1, 17)	5 (1, 17)	3 (2, 14)	11 (2, 28)	
Rango	0, 3,078	0, 3,078	0, 1,685	0, 1,402	

IL-1Ra					<0.001
Mediana (RIQ)	4,724 (62, 10,000)	4,493 (55, 10,000)	10,000 (3,784, 10,000)	10,000 (4,747, 10,000)	
Rango	8, 10,000	8, 10,000	8, 10,000	8, 10,000	
VEGF					<0.001
Mediana (RIQ)	154 (46, 461)	151 (44, 394)	267 (78, 10,000)	247 (82, 10,000)	
Rango	1, 10,000	1, 10,000	4, 10,000	7, 10,000	

¹Kruskal-Wallis rank sum test

Abreviaturas: N, total de pacientes; n, total de observaciones; **RIQ**, rango intercuartil; **SDG**, semana de gestación; **IL-1 α** , interleucina-1 alfa; **IL-2**, interleucina-2; **IL-1Ra**, receptor antagonista de interleucina-1; **VEGF**, factor de crecimiento endotelial vascular. **>37**, parto a término; **34-36** y **>34**, parto pretérmino.

diferencia significativa de concentración entre los grupos de parto, sin embargo, cuando se realiza la imputación esta diferencia se pierde. Curiosamente el impacto de la imputación fue mayor para esta citocina a pesar de tener la menor proporción de datos faltantes (12.8% vs 20.3%, 15.9% y 19.3%). También podemos observar que las medianas y el valor mínimo fueron menores después de la imputación, pues el objetivo era completar la distribución truncada.

Transformación de los datos

En la Figura 1 se visualizan las distribuciones de las citocinas después de realizar la imputación. En la sección **A** se observan las distribuciones de las concentraciones en su escala

original, y en la sección **B** posterior a una transformación logarítmica. Podemos observar que la transformación ayudó a centrar y a lograr cierta simetría en las distribuciones, especialmente para IL-2, por el contrario, para el caso de IL-1Ra no se observó un cambio considerable. Esto resalta que a pesar de tener una misma escala de medición (picogramos/mililitro) y de ajustarse a una misma distribución (gamma), cada marcador es un caso particular que debe evaluarse de manera independiente para poder aplicarse la mejor transformación de normalización posible. Sin embargo, para fines de interpretabilidad, o en este caso, de aplicación de un método de imputación, se prefiere una transformación que, por principio de parsimonia, cumpla con las necesidades de la mayor parte del conjunto de marcadores.

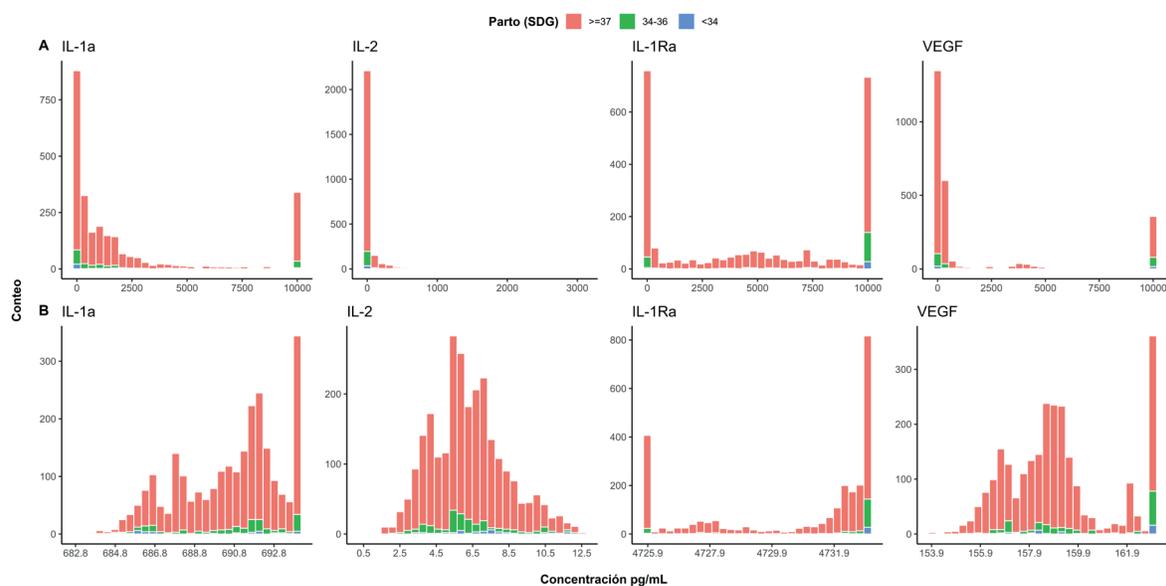


Figura 1. Distribuciones de las concentraciones de citocinas con y sin transformación logarítmica. A, concentraciones en su escala original. **B,** Concentraciones en escala logarítmica. Abreviaturas: pg, picogramos; mL, mililitro; IL-1 α , interleucina-1 alfa; IL-2, interleucina-2; IL-1Ra, receptor antagonista de interleucina-1; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular.

Análisis de Clases latentes

Teniendo en cuenta la gran variabilidad de las concentraciones y bajo la hipótesis sobre una expresión diferencial de citocinas durante el embarazo entre los nacimientos a término y pretérmino, se tomó todo el conjunto de datos para realizar un LCA para cada citocina y explorar la presencia de grupos de trayectorias de concentraciones asociadas con nuestra variable dependiente (SDG del parto/nacimiento). Se obtuvieron tres

clases que pudieron ser asociadas de manera empírica con los partos/nacimientos ≥ 37 SDG, entre 34-36 SDG y < 34 SDG (Tabla III). Podemos observar que el mayor porcentaje de error fue entre el grupo ≥ 37 SDG y el grupo de 34-36 SDG, pues 13 individuos fueron erróneamente clasificados como ≥ 37 SDG, que de acuerdo con las SDG, en realidad pertenecen al grupo de 34-36 SDG. En el grupo de < 34 SDG solamente un individuo fue clasificado erróneamente, el cual pertenece al grupo de 34-36 SDG.

Tabla III. Análisis de clases latentes

General	Parto en SDG		
	≥ 37	34-36	< 34
460 (100%)	407 (88.48 %)	40 (8.7 %)	13 (2.83 %)
Clases latentes			
G1	G3	G2	
420 (91.3%)	26 (5.65%)	14 (13.04%)	

Abreviaturas: SDG, semana de gestación.

Posteriormente, se realizó el análisis solo en el grupo de partos/nacimientos a término (Figura 2). En el análisis de cada una de las citocinas podemos observar que en todas las citocinas, excepto IL-1 α , se encontraron dos clases latentes, donde una de ellas es la clase predominante, la cual está caracterizada por una proporción mayor de individuos. Esta última, fue

utilizada para ajustar los modelos Joint posteriores, en un intento de homogeneizar nuestro grupo de referencia. Sin embargo, es claro que existe un comportamiento heterogéneo entre las mujeres que desarrollaron un parto a término, especialmente para el caso de la IL-1 α , lo que podría dificultar la correcta estratificación de riesgo del evento sino se tiene claro este comportamiento de las trayectorias.

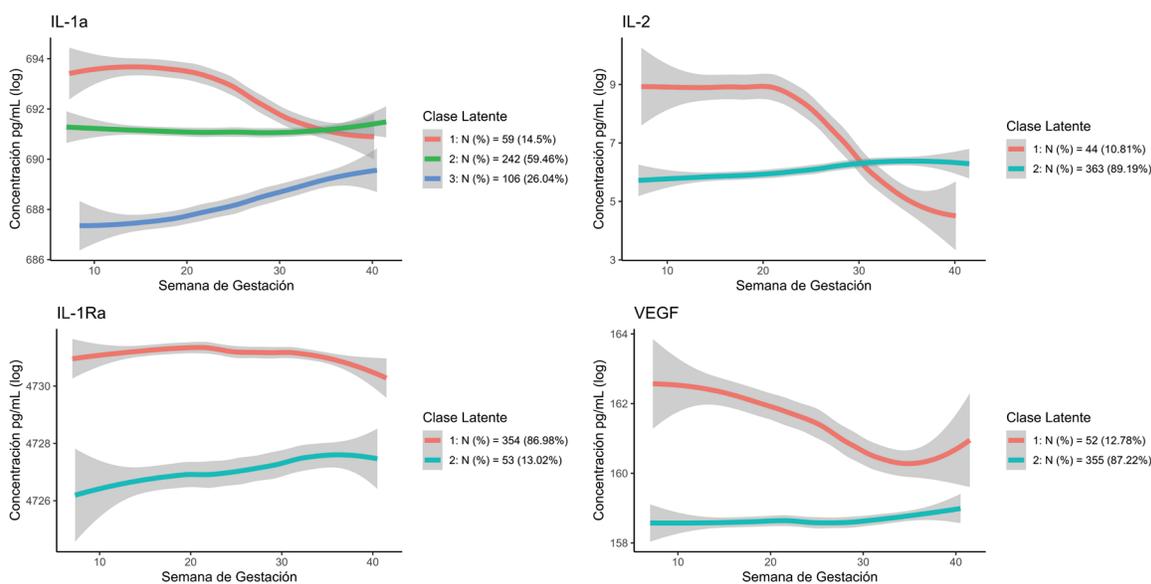


Figura 2. Análisis de clases latentes del grupo de partos/nacimientos a término. Para este análisis se utilizaron las concentraciones de citocinas como variable dependiente y la semana de gestación por visita como variable independiente. En las leyendas de cada panel se observa el número de clases latentes estimado y la proporción en frecuencia absoluta y porcentaje del número de individuos de cada clase. Abreviaturas: pg, picogramo; mL, mililitro; IL-1 α , interleucina-1 alfa; IL-2, interleucina-2; IL-1Ra, receptor antagonista de interleucina-1; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular.

Modelos Joint

En este apartado además de presentar los resultados del modelo, también se resaltaré una aplicación del LCA. En la Figura 3, se muestran las trayectorias de las concentraciones de citocinas a lo largo del embarazo estratificadas por grupo de parto/nacimiento. En la sección **A** observamos

las predicciones del modelo de regresión lineal mixto que incluye a la clase latente más grande del grupo a término y en la sección **B** se observan las predicciones del modelo que incluye todos los datos del grupo a término. En comparativa podemos observar que el error de la regresión es menor cuando se utiliza el LCA, visualizándose como intervalos de confianza más estrechos. Por lo tanto, este abordaje nos

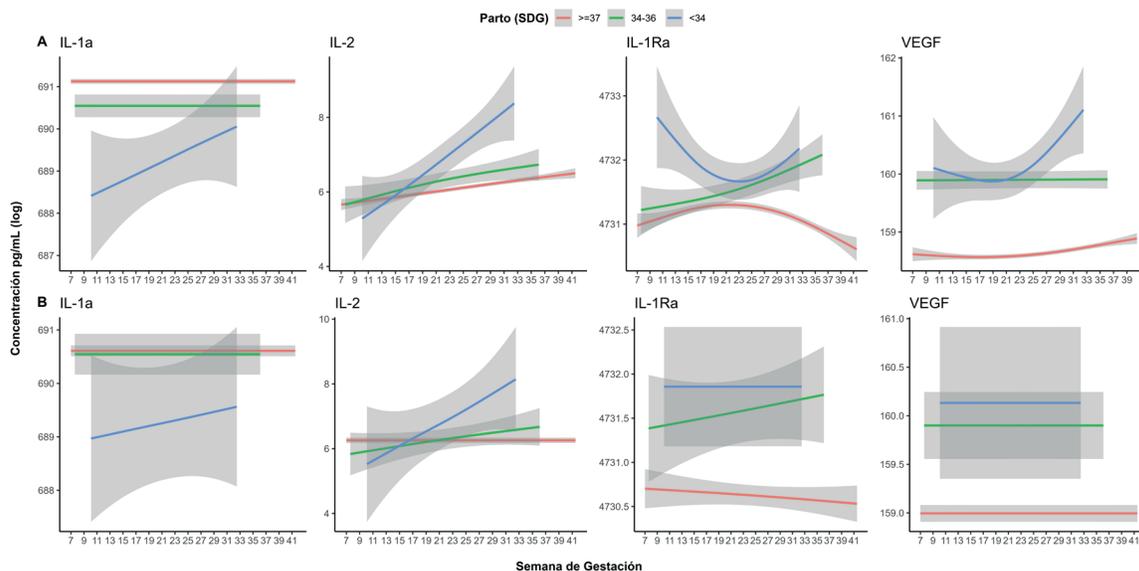


Figura 3. Predicciones del modelo de regresión lineal mixto. A, Modelos ajustados utilizando el LCA para el grupo de partos/nacimientos a término. B, Modelos ajustados con todo el conjunto de datos del grupo de partos/nacimientos a término. La región sombreada de color gris representa los intervalos de confianza al 95% de las líneas de regresión. Abreviaturas: pg, picogramo; mL, mililitro; IL-1 α , interleucina-1 alfa; IL-2, interleucina-2; IL-1Ra, receptor antagonista de interleucina-1; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; LCA, análisis de clases latentes. SDG; semana de gestación. ≥ 37 , parto a término; 34-36 y ≥ 34 , parto pretérmino.

dará estimaciones más homogéneas y precisas sobre el riesgo asociado al parto pretérmino. En la Tabla IV se reportan los cocientes de riesgo o *hazard ratios* (HR) estimados por el modelo Joint usando los datos completos del grupo a término y utilizando el LCA para el mismo grupo.

En la tabla también se reporta el Criterio de Información de la Devianza (DIC, por sus siglas en inglés) que al igual que el BIC es una medida de bondad de ajuste de un modelo y frecuentemente es utilizado como un criterio para la selección de modelos. Podemos observar que los modelos

Tabla IV. Cocientes de riesgos (Hazard Ratio) estimados por los modelos Joint.

Modelo	Hazard Ratio	2.5% ¹	97.5% ¹	p-value	DIC ²
Utilizando el LCA					
IL-1a (value ³)	0.52	0.31	0.77	0.00022	6,267.913
IL-1a (slope ⁴)	6.497515 $\times 10^9$	1.858227 $\times 10^6$	2.642646 $\times 10^{14}$	0.00000	
IL-2 (value ³)	0.87	0.43	1.52	0.71056	8,691.429
IL-2 (slope ⁴)	1.514839 $\times 10^{18}$	6.234445 $\times 10^1$ ₀	5.779805 $\times 10^{27}$	0.00000	

IL-1Ra (value ³)	0.97	0.55	2.19	0.81278	10,679.241
IL-1Ra (slope ⁴)	0.00	0.00	0.00	0.00000	
VEGF (value ³)	2.01	0.67	8.37	0.27589	8,906.102
VEGF (slope ⁴)	0.00	0.00	0.25	0.03033	

Muestra Completa

IL-1a (value ³)	1.19	0.95	1.48	0.12067	11,391.926
IL-1a (slope ⁴)	1.275655×10^{12}	4.547926×10^8	3.930784×10^{15}	0.00000	
IL-2 (value ³)	0.87	0.43	1.52	0.71056	8,691.429
IL-2 (slope ⁴)	1.514839×10^{18}	6.234445×10^1 ₀	5.779805×10^{27}	0.00000	
IL-1Ra (value ³)	0.94	0.65	1.32	0.78567	12,751.922
IL-1Ra (slope ⁴)	0.00	0.00	0.00	0.00000	
VEGF (value ³)	0.70	0.49	0.99	0.04444	11,184.708
VEGF (slope ⁴)	0.00	0.00	0.00	0.00000	

¹Intervalo de probabilidad.

²Criterio de Información de la Devianza.

³Estimación puntual.

⁴Estimación de la tasa de aumento/disminución.

Abreviaturas: IL-1a, interleucina-1 alfa; IL-2, interleucina-2;

que se ajustaron utilizando el LCA tienen menor DIC, por lo tanto, el error del modelo es menor y las estimaciones suelen ser más precisas.

Cabe señalar que la magnitud de algunos HR fue demasiado pequeña y se encuentran con un valor de cero, como es en el caso de la estimación de la tasa de aumento/disminución de los modelos de IL-1Ra y VEGF. Por el contrario, para las

citocinas IL-1a e IL-2, donde la pendiente de los grupos con parto/nacimiento pretérmino es más pronunciada, se observan HR extremadamente grandes. Esto interpreta que cada unidad de aumento en la tasa de aumento de las concentraciones de la citocina, el riesgo asociado de parto/nacimiento pretérmino es extremadamente alto. En cuanto a las estimaciones puntuales podemos interpretarlas de la siguiente manera (para el caso

del modelo de IL-1a utilizando el LCA): por cada unidad de incremento en la concentración de esta citocina el riesgo asociado de parto/nacimiento pretérmino disminuye en un 48% (HR=0.52, IC 95%=0.31-0.77, p-value=0.00022).

Discusión

La creación de buenas prácticas de imputación requiere un conocimiento exhaustivo sobre los datos, especialmente del patrón de datos faltantes, junto con un buen juicio estadístico (8). Sin embargo, los datos reales son más ricos y complejos que los modelos estadísticos que se les aplican. Idealmente, los valores imputados deberían verse como datos reales en todos los aspectos, especialmente si se van a ajustar múltiples modelos sobre los datos imputados.

Los factores de riesgo clínicos tradicionales generalmente se miden con poca frecuencia y se evalúan sobre la base de puntos de corte y rangos normales o anormales asociados con una salud óptima, un riesgo mínimo de enfermedad o rangos de referencia que contienen al 95% de la población de referencia (5). Sin embargo, los rangos de salud óptimos difieren según el individuo en función de factores como la edad, el sexo, el origen étnico, la geografía, la estación, etc. Esto conduce a diferencias en los valores óptimos o de riesgo dificultando la comparación con poblaciones específicas. Por lo tanto, el uso de modelos estadísticos como el modelo Joint abre la posibilidad de estimar la probabilidad del evento de acuerdo a las mediciones de un mismo individuo durante su seguimiento. O en el caso del LCA al descubrimiento de subpoblaciones con características fenotípicas diferentes a lo que conocemos como población de referencia.

La perspectiva basada en hipótesis es aquella que establece sus suposiciones sobre cuál se cree que es la respuesta y luego encuentra hechos para validar o refutar. En cambio, la perspectiva basada en datos utiliza herramientas computarizadas, algorítmicas y de aprendizaje automático, que se pueden configurar para reconocer patrones en datos de pacientes, datos de casos históricos, tratamientos y eventos, destacando así patrones que de otro modo habrían escapado a nuestra atención. También se pueden utilizar como un mecanismo de seguridad para comprobar la coherencia de las estrategias propuestas con las opciones anteriores. De esta manera, podemos concluir que ambos enfoques se complementan para una mejor descripción del fenómeno y nos ayudan a la toma de decisiones, a postular teorías o a continuar con otras estrategias de análisis.

Referencias

- Smith, R. (2007). Parturition. *N Engl J Med*, 356(3), 271–283.
- Gomez-Lopez, N., Vega-Sanchez, R., Castillo-Castrejon, M., Romero, R., Cubeiro-Arreola, K., & Vadillo-Ortega, F. (2013). Evidence for a role for the adaptive immune response in human term parturition. *Am J Reprod Immunol*, 69(3), 212–230.
- Kim, S. A., Park, K. H., Lee, S. M., Kim, Y. M., & Hong, S. (2022). Inflammatory Proteins in the Amniotic Fluid, Plasma, and Cervicovaginal Fluid for the Prediction of Intra-Amniotic Infection/ Inflammation and Imminent Preterm Birth in Preterm Labor. *Am J Perinatol*, 39(7), 766–775.
- Stranik, J., Kacerovsky, M., Andrys, C., Soucek, O., Bolehovska, R., et al. (2022). Intra-amniotic infection and sterile intra-amniotic inflammation are associated with elevated concentrations of cervical fluid interleukin-6 in women with spontaneous preterm labor with intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 35(25), 4861–4869.
- Torkamani, A., Andersen, K. G., Steinhubl, S. R., & Topol, E. J. (2017). High-Definition Medicine. *Cell*, 170(5), 828–843.
- O'Neill, M. S., Osornio-Vargas, A., Buxton, M. A., Sánchez, B. N., Rojas-Bracho, L., et al. (2013). Air pollution, inflammation and preterm birth in Mexico City: study design and methods. *Sci Total Environ*, 448, 79–83.
- Ancira-Moreno, M., O'Neill, M. S., Rivera-Dommarco, J. Á., Batis, C., Rodríguez-Ramírez, S., et al. (2020). Dietary patterns and diet quality during pregnancy and low birthweight: The princesa cohort. *Matern Child Nutr*, 16(3), e12972.
- Genser, B., Cooper, P. J., Yazdanbakhsh, M., Barreto, M. L., & Rodrigues, L. C. (2007). A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC Immunol*, 8, 27.
- Van Buuren, S. (2018). Flexible Imputation of Missing Data, Second Edition (2nd ed.). *Chapman and Hall/CRC*. <https://doi.org/10.1201/9780429492259>
- Ballenberger, N., Lluís, A., von Mutius, E., Illi, S., & Schaub, B. (2012). Novel statistical approaches for non-normal censored immunological data: analysis of cytokine and gene expression data. *PLoS One*, 7(10), e46423.
- Austin, P. C., Escobar, M., & Kopec, J. A. (2000). The use of the Tobit model for analyzing measures of health status. *Qual Life Res*, 9(8), 901–910.
- Uh, H. W., Hartgers, F. C., Yazdanbakhsh, M., & Houwing-Duistermaat, J. J. (2008). Evaluation of regression methods when immunological measurements are constrained by detection limits. *BMC Immunol*, 9, 59.
- Tobin, J. (1958). Estimation of Relationships for Limited Dependent Variables. *Econometrica*, 26(1):24.
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc*, 53(282), 457–481.
- Paas-Oliveros, E. (2019) Origen de los datos censurados en inmunoensayos luminiscentes del tipo multiplex y su integración a análisis estadísticos [tesis doctoral]. México: Facultad de Ciencias, UNAM.
- Harrell, F.E. (2015). Transform-Both-Sides Regression. In: Regression Modeling Strategies. Springer Series in Statistics. Springer, Cham.
- Yeo & R. A. Johnson (2000). A new family of power transformations to improve normality or symmetry. *Biometrika*, 87, 954–959.
- Chatterjee, S., & Hadi, A. S. (1986). Influential Observations, High Leverage Points, and Outliers in Linear Regression. *Statistical Science*, 1(3), 379–393.
- Peterson RA, Cavanaugh JE (2020). “Ordered quantile normalization: a semiparametric transformation built for the cross-validation era.” *J Appl Stat*, 47(13-15), 2312-2327.
- Peterson RA (2021). “Finding Optimal Normalizing Transformations

- via bestNormalize.” *The R Journal*, 13(1), 310–329. doi:10.32614/RJ-2021-041.
21. Box, G. E. P., & Cox, D. R. (1964). An Analysis of Transformations. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*, 26(2), 211–252.
 22. Goerg, G. M. (2011). Lambert w random variables—a new family of generalized skewed distributions with applications to risk estimation. *Ann Appl Stat*, 5(3), 2197–2230.
 23. Fitzmaurice, G., Davidian, M., Verbeke, G., Molenberghs, G. (2009) Longitudinal Data Analysis. Handbooks of Modern Statistical Methods. *Chapman & Hall/CRC*, Boca Raton.
 24. Proust-Lima, C., Philipps, V., & Lique, B. (2017). Estimation of Extended Mixed Models Using Latent Classes and Latent Processes: The R Package lcmm. *J Stat Softw*, 78(2), 1–56.
 25. Rizopoulos, D., & Lesaffre, E. (2014). Introduction to the special issue on joint modelling techniques. *Stat Methods Med Res*, 23(1), 3–10.
 26. He, B., & Luo, S. (2016). Joint modeling of multivariate longitudinal measurements and survival data with applications to Parkinson’s disease. *Stat Methods Med Res*, 25(4), 1346–1358.
 27. Rizopoulos, D. (2016). The R Package JMBayes for Fitting Joint Models for Longitudinal and Time-to-Event Data Using MCMC. *J Stat Softw*, 72(7), 1–46.
 28. Robert, C. P., & Casella, G. (2013). Monte Carlo statistical methods. (2nd ed.). New York, NY, USA: *Springer*.



DR. DANIEL EDUARDO SANDOVAL COLIN
ORCID 0000-0003-0935-1491

El Dr. Daniel Eduardo Sandoval Colin es médico cirujano por la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ganador del premio al servicio social “Dr. Gustavo Baz Prada” por su trabajo analítico en una cohorte perinatal de la Unidad de Vinculación Científica UNAM-INMEGEN. Actualmente es Candidato a Doctor por el Plan de Estudios Combinados en Medicina (PECEM) de la Facultad de Medicina, especialista en estadística aplicada por el Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas (IIMAS) de la misma universidad y médico adscrito de la Oficina de Apoyo Sistemático para la Investigación Superior (OASIS) del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Ha sido autor principal y colaborador de artículos científicos en revistas como “Reproductive Sciences”, “Aging Cell” y “Environmental Research”. Además, es miembro del “Preterm Birth International Collaborative” (PREBIC), una colaboración multinacional de médicos y científicos que tienen como objetivo mejorar los desenlaces del embarazo, el parto y optimizar la salud infantil.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 81-90

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

El papel de las proteínas de choque térmico en la homeostasis cardiovascular.

The role of heat shock proteins in cardiovascular homeostasis.

Guerrero-Beltrán, Carlos Enrique^{1*}.

¹ Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey (campus Monterrey).

*Correspondencia. Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey, Av. Ignacio Morones Prieto 3000, Sertoma, Monterrey, N.L. (México), C.P. 64710, Tel. + 52 (81) 88882030, enriqueguerrero@tec.mx

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad a nivel mundial, con un aumento constante y alarmante en las últimas décadas, convirtiéndose así en un desafío de salud global. La etiología de las enfermedades cardiovasculares es diversa, múltiples estímulos como el calor y el frío inducidos por el cambio climático, los contaminantes ambientales, infecciones, etc., conducen a efectos nocivos para el sistema cardiovascular, e.g., la remodelación de tejidos, estrés oxidante y respuestas inflamatorias.

Las respuestas inflamatorias representan un mecanismo de defensa en el que las células inmunes y no inmunes protegen al huésped de patógenos peligrosos, estimulando la reparación y recuperación de los tejidos. El receptor celular tipo Toll 4 (TLR4), se destaca entre otros receptores de reconocimiento de patrones, por su abundante expresión y capacidad para provocar respuestas inmunes robustas ante el reconocimiento de patógenos, proteínas endógenas y material genético, convirtiéndose en un objetivo de interés para la intervención terapéutica. Las implicaciones derivadas de respuestas inflamatorias descontroladas en tolerancia inmunológica y las alteraciones fisiológicas aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, la primera causa de muerte a nivel mundial.

La proteína de choque térmico 60 (HSP 60) es una chaperonina conservada evolutivamente y ha sido asociada tradicionalmente con un papel fundamental en el

Abstract

Cardiovascular diseases are the leading cause of global mortality, with an alarming and decades-steady increase in cases worldwide, becoming a global health challenge despite medical advances. Cardiovascular diseases etiology is diverse, multiple stimuli such as heat and cold exerted by climate change, environmental pollutants, infections, etc., lead to deleterious effects for the cardiovascular system, e.g., tissue remodeling, oxidative stress, endothelial dysfunction and inflammatory responses.

Inflammatory responses represent a defense mechanism in which, immune and non-immune cells, protect the host from dangerous pathogens, stimulating tissue repair and recovery. The cellular Toll like receptor 4 (TLR4), outstands among other pattern recognition receptors, for its abundant expression and capacity to elicit robust immune responses upon pathogen, endogenous proteins, and DNA material recognition, becoming a target of interest for therapeutic intervention. Implications derived from uncontrolled inflammatory responses into immune tolerance, and physiological alterations increases the risk of developing cardiovascular diseases, leader cause of death worldwide. Heat Shock Protein 60 (HSP 60), an evolutionary conserved chaperonin traditionally associated to a pivotal role in development of inflammatory maladies, has been reported to possess anti-inflammatory properties in TLR4-mediated diseases such as cardiopathies, diabetes and immune maladies,

desarrollo de enfermedades inflamatorias, en enfermedades mediadas por los TLR4 como cardiopatías, diabetes y enfermedades inmunitarias, sin embargo, también se ha observado propiedades antiinflamatorias cuando se presenta en una conformación peptídica o está presente a bajas concentraciones. La descripción del efecto que esta proteína o sus péptidos ejercen sobre las células que expresan TLR4 sigue siendo difícil de integrar. En este trabajo, se podrá encontrar cómo diferentes estímulos pueden ser regulados por las HSPs y cómo la HSP 60 puede mantener la homeostasis fisiológica o puede conducir a la progresión de enfermedades cardiovasculares.

Palabras clave: Proteínas de choque térmico, enfermedades cardiovasculares, inflamación, cambio climático, Receptores de tipo Toll.

when presented in a peptide conformation, nonetheless, the description of the effect that these peptides exert on TLR4-expressing cells remains elusive. In this work, it can be found how different stimuli can be regulated by HSPs, and how HSP 60, can maintain physiological homeostasis or can induce to cardiovascular diseases.

Keywords: Heat shock proteins, cardiovascular diseases, inflammation, climate change, Toll-like receptors.

Introducción

Considerando que el cambio climático no es tan simple como el aumento de las temperaturas, sino un proceso complejo, que crea condiciones meteorológicas favorables para producir patrones climáticos extremos como olas de calor, olas de frío, tormentas, sequías, etc., hoy comenzamos a entender que estos fenómenos predisponen secundariamente a una gran variedad de problemas de salud, incluyendo enfermedades infecciosas, trastornos psiquiátricos, desnutrición, diferentes tipos de cáncer y la mayoría de los trastornos crónicos no transmisibles, de los cuales las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la principal causa de muerte (1).

La respuesta fisiológica como resultado a los cambios de temperatura en un sistema, un órgano o tejido, así como las alteraciones en las vías bioquímicas y moleculares a nivel celular; poco a poco se han asociado a los mecanismos por los cuales el cambio climático favorece el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares tales como: la hipertensión, las arritmias, la aterosclerosis, la trombosis y otros factores de riesgo, que conducen a diversos desenlaces cardiovasculares como el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca, los accidentes cerebrovasculares, entre otros; encontrándose aún más una relación entre el cambio climático, el calentamiento global o los contaminantes ambientales, que impulsan a revisar y conjuntar estadísticos sobre estas condiciones a lo largo de las últimas décadas y su papel en la salud.

En los últimos años, varios estudios han investigado los efectos del cambio climático sobre la salud cardiovascular, pero los resultados han sido inconsistentes, ya que algunos estudios sugieren que las temperaturas más cálidas representan un mayor riesgo y otros concluyen lo contrario, incluso estableciendo las condiciones presentes en las temporadas de verano o invierno, como factores de riesgo cardiovascular (2).

La hipertensión arterial sistémica se considera uno de los principales factores de riesgo para la incidencia de eventos

cardiovasculares y la disminución de la sobrevivencia. Wang y colaboradores (2017), realizaron el primer metaanálisis de la relación entre la temperatura ambiente y la presión arterial, informando una asociación inversa significativa consistentemente (3). Sin embargo, en otro metaanálisis que estudió la relación entre la temperatura ambiente y el infarto de miocardio, se encontró una curva de exposición-respuesta, concluyendo que en realidad se trata de una exposición a temperaturas extremas (golpes de temperatura), en lugar de la exposición paulatina al calor o al frío por sí sola, lo que representa el mayor riesgo (4). En cuanto a los eventos cerebrovasculares, los estudios son más limitados y los metaanálisis no son concluyentes. Sin embargo, alguna evidencia sugiere que las temperaturas frías están más asociadas con accidentes cerebrovasculares isquémicos, mientras que las temperaturas altas parecen estar asociadas con accidentes cerebrovasculares hemorrágicos (5).

Estos estudios apoyan o sugieren la hipótesis de que la incapacidad de adaptación térmica a cambios bruscos de temperatura (frío/calor) ejerce un efecto directo sobre el bienestar cardiovascular. Sin embargo, como un todo, la temperatura es solo un actor dentro de una compleja red de interacciones biológicas, geográficas y sociodemográficas. De hecho, si bien se sabe que algunas poblaciones como mujeres, adultos mayores, niños pequeños, personas con comorbilidades preexistentes y sectores de nivel socioeconómico bajo son más susceptibles a los efectos de la variación de temperatura (6), es importante considerar que la mayor parte de esta evidencia proviene de estudios realizados en áreas urbanas donde el cambio climático coexiste con otros factores de riesgo cardiovascular conocidos como los contaminantes del aire, particularmente el ozono y el material particulado, que podrían actuar como variables cofundadoras (7).

La salud cardiovascular y las proteínas de choque térmico

El corazón es un órgano que, para satisfacer sus demandas energéticas, funciona preferentemente por fosforilación oxidante, por lo que depende en gran medida del flujo sanguíneo continuo o incluso una escasez menor; debido a una obstrucción que puede alterar su contractilidad y conducir a la muerte. Los tejidos cardíacos dependen de mecanismos protectores que incluyen una circulación colateral, un sistema antioxidante y otras respuestas intracelular al estrés que salvaguarden su integridad. Entre estos esquemas de defensa, la respuesta de las proteínas de choque térmico (HSPs) es una característica evolutiva notablemente preservada que está presente tanto en organismos procariontes como eucariontes. La amplia heterogeneidad de respuestas ejercidas por este sistema también es el resultado del número considerable de miembros de esta familia de proteínas (8).

Las proteínas de choque térmico o HSPs (por sus siglas en inglés, *Heat Shock Proteins*) son una familia de chaperonas que se encuentran en diferentes tipos de organismos que van

desde bacterias, levaduras y humanos. Las HSPs son una gran familia de proteínas intracelulares que recibieron su nombre después de determinar que su regulación responde a golpes de calor (choque térmico), y su propósito general es otorgar una protección contra esta condición que de otro modo sería amenazante para la homeostasis celular. El estrés térmico es uno de los principales factores que desencadenan un mal plegamiento y/o la agregación, o desnaturalización de las proteínas, lo que provoca una respuesta que conduce principalmente a la inducción de la transcripción de determinados genes que codifican para las HSPs. A esta familia de proteínas, también se les llama chaperonas moleculares, un nombre que a menudo se usa indistintamente con HSP, sin embargo, algunas HSPs no tienen función de acompañamiento y actúan como proteínas multifuncionales (8). La nomenclatura tradicional de estas proteínas designa a cada uno de sus miembros con las siglas de la familia, seguidas de su respectivo peso molecular, como se describe en la Tabla I.

Tabla I. Diferentes proteínas de choque térmico de mamíferos y su función fisiológica general

Proteína de choque térmico (HSP)	Función
HSP 27	Como parte de la familia de proteínas pequeñas de choque térmico (sHSP), esta proteína participa como chaperona, en la citoprotección, antiapoptosis y función antioxidante.
HSP 32	Es una proteína involucrada en la degradación de la biliverdina, aumenta en el contexto de ciertos factores estresantes, como el aumento de la temperatura, actúa en prevención contra la intoxicación por metales pesados y la exposición a especies reactivas del oxígeno.
HSP 60	Junto con HSP10, esta proteína tiene actividad de chaperona, en mecanismos de inmunorregulación y citoprotección.
HSP 70	Esta proteína actúa como chaperonina y participa en la autofagia, antiapoptosis y citoprotección.
HSP 90	Esta proteína ayuda en las funciones de chaperonina, en la señalización intracelular, proapoptosis y el control del ciclo celular.
HSP 110	Esta proteína funciona como chaperona y proporciona un efecto termotolerante para las células.

Entre estos patrones de defensa, las respuestas de las HSPs son una característica notablemente preservada en la evolución ya que están presentes en los organismos a lo largo de la cadena evolutiva. La amplia heterogeneidad de las respuestas provocadas por este sistema también es el resultado del número considerable de miembros de esta proteína. Como se mencionó anteriormente, las HSPs se identificaron originalmente debido a su pronta activación después de aumentos bruscos de temperatura y se teorizó que su función era para ayudar a las células a adaptarse y sobrevivir en estas circunstancias.

El papel de la proteína de choque térmico 60

La HSP 60 (de 60 kDa), es una destacada proteína de la familia de las HSPs, que se ha estudiado exhaustivamente debido a sus propiedades cardioprotectoras. La HSP 60 se clasifica en

dos grupos diferentes de chaperoninas (nombre que se usa indistintamente con HSP 60). El grupo I de chaperoninas se puede encontrar en las mitocondrias, siendo ésta su ubicación principal y en los cloroplastos de los eucariotas, pero también pueden tener otras ubicaciones, como el citosol, la membrana y la superficie celulares. También se pueden encontrar en el citoplasma procariota. El grupo II de chaperoninas se encuentra principalmente en el citoplasma de las células eucariotas, así como en microorganismos arqueobacterianos. La HSP 60, posee propiedades cardioprotectoras, que incluyen el procesamiento de proteínas mal plegadas, cuenta con una actividad antiapoptótica y permite la dinamización de factores de transcripción clave para la biogénesis mitocondrial y el manejo del calcio. Paradójicamente, esta misma proteína también puede ser una fuente de inflamación no solo para los tejidos de los que proviene, sino también para los tejidos periféricos. Se ha demostrado que la HSP 60

estimula tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa, comportándose como un patrón molecular asociado a daño (DAMP por sus siglas en inglés *Damage-Associated Molecular Pattern*), provocando respuestas inmunitarias

robustas que desencadenan mecanismos de inflamación, que en la actualidad se consideran como una parte detonante en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares (9). Figura 1.

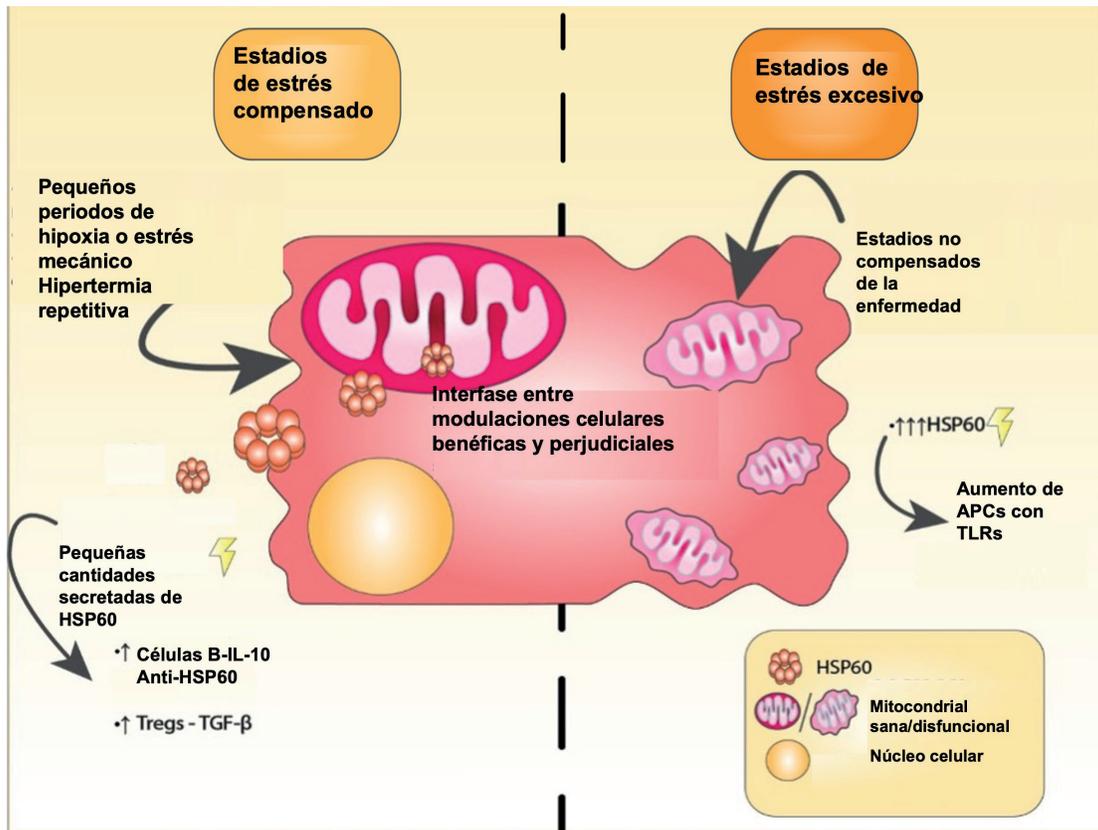


Figura 1. Estadios de estrés compensado vs. estados de estrés excesivo. La HSP 60 funciona de manera bimodal dependiendo de los insultos involucrados. En la mitad izquierda de la imagen se pueden observar los estadios de estrés compensados que generan una adaptación favorable de la mitocondria y la regulación positiva de los niveles de HSP 60. Con estas chaperonas reguladas al alza, aumenta la supervivencia de los cardiomiocitos. Tenga en cuenta que también se excretan pequeñas cantidades de moléculas de la HSP 60 con la ayuda de los exosomas, lo que inicia la respuesta anti-HSP60 y la activación de las células Tregs = efecto antiinflamatorio. En la mitad derecha de la imagen, el estrés excesivo altera varios componentes relacionados con la supervivencia celular, siendo el efecto neto una inflamación celular y el aumento de la permeabilidad mitocondrial. Esto aumenta dramáticamente los niveles de la HSP 60 en el espacio extracelular (con otros marcadores de necrosis). La HSP 60 actúa como un potente activador de las células presentadoras de antígeno (APCs) aumentando extracelularmente la inflamación y la remodelación del tejido (modificado de (8)).

Por estas razones, la HSP 60 está involucrada en la supervivencia celular, la inflamación y la inmunización tras el reconocimiento y la activación de los receptores de tipo Toll 4 (TLR4) (8). Tras la translocación de la superficie celular o en los exosomas, la HSP 60 es capaz de inducir la apoptosis celular en cardiomiocitos de ratas adultas; además, la HSP 60 extracelular se asocia con cambios proinflamatorios y apoptóticos, y funge como un marcador celular para su detección por parte del sistema inmunitario y otras líneas celulares. Los avances en la red del sistema inmunitario sugieren que la HSP 60 también puede ayudar a aliviar el entorno inflamatorio tras el reconocimiento de TLR4 de una manera dependiente de la dosis, ya que se ha informado que

los péptidos de HSP60 inducen un efecto antiinflamatorio a través de la activación de las células B, T reguladoras y células T antiergotípicas (10). Figura 2.

Esta dualidad en las funciones de la HSP 60 (la proteína completa o sus formas peptídicas), ha generado un enorme interés en su estudio con miras en la aplicación para la reducción de placas ateroscleróticas, artritis idiopática juvenil, diabetes y varias enfermedades autoinmunes y proinflamatorias (9). Por lo tanto, con estas observaciones se ha determinado que la HSP 60 juega un papel importante en la respuesta biológica ante condiciones homeostáticas y de estrés celular.

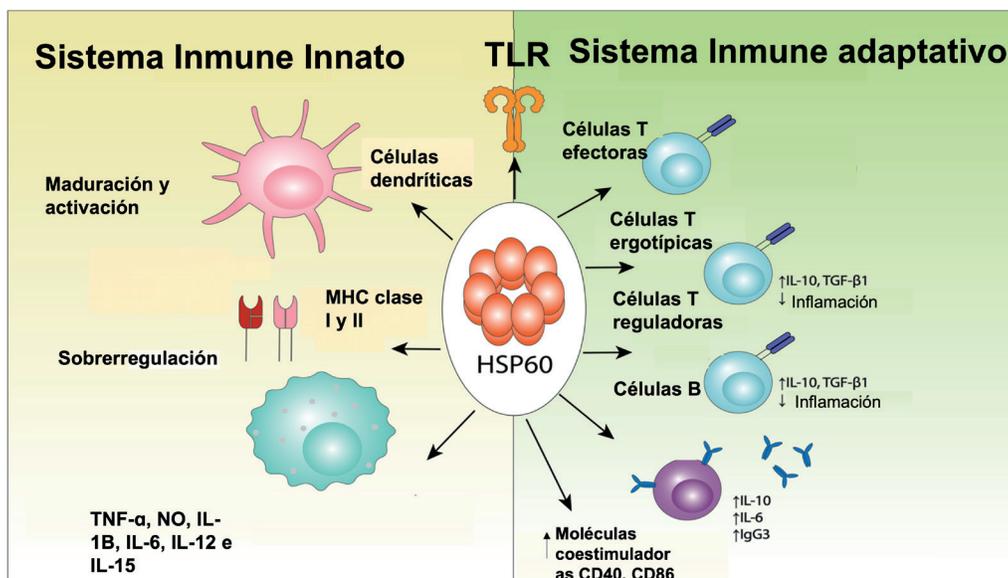


Figura 2. Funciones inmunitarias de la HSP 60. La HSP 60 es reconocida por los TLRs tanto en macrófagos como por las células dendríticas (DCs) lo que provoca respuestas proinflamatorias. Esto se logra a través de diferentes mecanismos, incluidos los de presentación de antígenos mediante las células presentadoras de antígenos, dando como resultado una mayor maduración de las DCs, la secreción de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos y la regulación positiva de la molécula coestimuladora del complejo mayor de histocompatibilidad I y II (MHC-I y MHC-II), o de moléculas como las CD86 y CD40. La HSP 60 también es reconocida por receptores de las células T (TCR) y pueden inducir una función proinflamatoria a través de la activación de las células T efectoras o de suprimir la inflamación a través de la modulación de células T reguladoras y antiergotípicas. Los péptidos de la HSP 60 que son reconocidos por las células B pueden provocar un mecanismo antiinflamatorio a través de la secreción de interleucina (IL)-10 o una respuesta proinflamatoria a través de la liberación de anticuerpos contra la HSP 60. Como tal, los efectos inmunitarios provocados por esta proteína son variables y están sujetos a cambios en su concentración local (modificado de (8)).

La proteína de choque térmico 60 en la patología cardiovascular

Ya se ha hablado que la expresión de las HSPs se asocia con efectos benéficos o perjudiciales, según el fenotipo celular y el papel específico de la HSP, ya que estas proteínas pueden mejorar la tolerancia al estrés térmico y la plasticidad térmica, pero también puede provocar el arresto del ciclo celular, la activación de mecanismos proinflamatorios y conducir a la muerte celular. En el contexto del calentamiento global, las temperaturas ambientales extremas pueden conducir a una sobreexpresión aguda de las HSPs debido al estrés por calor o frío. Se ha sugerido que la variación en la expresión de las HSPs podría ser el resultado de una respuesta de adaptación celular destinada a hacer frente a diversas condiciones de temperatura y cambios ambientales. Sin embargo, la sobreexpresión crónica de esta proteína se asocia a un daño y progresión de enfermedades cardiovasculares (11).

Como se ha mencionado anteriormente, las enfermedades cardiovasculares son la consecuencia de una plétora de estímulos inductores de estrés que pueden actuar sobre los tejidos cardíacos, principalmente el miocardio, inhabilitando la estructura y función del corazón. Las placas de las arterias coronarias son los principales contribuyentes de la disminución progresiva del suministro de oxígeno y de nutrientes al miocardio. La inflamación *in situ* también es un factor importante característico de eventos dañinos en curso, y puede manifestarse con la secreción de citoquinas

de las células residentes, desencadenando programas proinflamatorios con el reclutamiento de células del sistema inmune a las áreas afectadas. La incapacidad de disminuir o despejar las condiciones estresantes en un sistema celular da como resultado la generación de lesiones repetidas en los tejidos involucrados y la inducción de la muerte celular programada, un hallazgo común que conduce a la disfunción orgánica en estas patologías.

La literatura ha indicado que la presencia extracelular de la chaperonina (HSP 60) contribuye a desencadenar varios eventos autoinmunes que conllevan a la progresión de las enfermedades cardiovasculares, lo que contrasta con las funciones normalmente atribuidas de la proteostasis de esta chaperona. Se han identificado concentraciones marcadamente altas de la HSP 60 en pacientes con hipertensión límite, y esto se ha asociado con un mayor grosor de la íntima/media de las arterias carótidas, lo que indica la presencia de placas ateromatosas (12). Además, se han observado niveles más altos de anticuerpos circulantes anti-HSP 60 y estos se vincularon con un mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria de manera dosis-dependiente.

Por otra parte, en la aterosclerosis, una enfermedad que actualmente es considerada como autoinmune y cuya progresión lenta pero constante se produce debido a una serie de procesos inflamatorios crónicos en la íntima arterial (la capa de la pared arterial justo debajo del endotelio), que puede causar la obstrucción parcial o total del flujo sanguíneo del corazón por la formación de una placa

que reduce ampliamente el diámetro de la vasculatura, privando al músculo cardíaco del adecuado flujo sanguíneo y suficiencia de oxígeno causando isquemia cardíaca. La evidencia ha demostrado que las HSP 60 de bacterias y del humano participan en la fisiopatología de la aterosclerosis en diferentes estadios de la progresión de la enfermedad, determinando su importancia como marcador de enfermedad y como un potencial blanco terapéutico (13).

Por último, la insuficiencia cardíaca es responsable de una gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial y debido a sus variables etiologías y su asociación con múltiples enfermedades crónicas, se ha convertido en una de las afecciones cardíacas más estudiadas. El advenimiento de un mejor pronóstico para el tratamiento de eventos agudos de insuficiencia cardíaca y el envejecimiento general de la población ha llevado en última instancia a un aumento exponencial en su prevalencia; lo que justifica la necesidad de una mejor comprensión de la fisiopatología y las opciones terapéuticas. En lo que respecta a las HSPs, se han realizado varios estudios en los últimos años, generalmente mostrando una correlación entre la insuficiencia cardíaca y aumento de los niveles de HSP circulantes y en el tejido vascular. Knowlton y colaboradores (2017), realizaron pruebas para determinar la expresión de las HSP en la insuficiencia cardíaca relacionada a la miocardiopatía dilatada y cardiopatía isquémica (14).

Los resultados mostraron que, en corazones con miocardiopatía dilatada, tanto la expresión de HSP 60 como la de HSP 27 aumentaron significativamente, 2.5 y 2.0 veces, respectivamente. Con ello, se denota la relevancia de las HSPs y en particular la HSP 60 en la progresión de diversas enfermedades cardiovasculares, siendo este un blanco terapéutico de gran relevancia.

Mecanismos de inflamación inducidos por la HSP 60

Los TLRs son receptores de reconocimiento de patrones o PRR (por sus siglas en inglés, *Pattern-Recognition Receptors*) presentes en varios tipos de células como las células polimorfonucleares, mastocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T (células T) y linfocitos B (células B). Estos receptores pueden tener distintas localizaciones: los TLR11, TLR6, TLR5, TLR4, TLR2 y TLR1 se encuentran en la superficie de la célula mientras que los TLR9, TLR8, TLR7 y TLR3 residen intracelularmente. Estos receptores reconocen diferentes estructuras dependiendo del subtipo del TLR (10).

En las células del corazón, específicamente en los cardiomiocitos, está bien establecido que los receptores de tipo Toll (TLR) se expresan en la membrana celular, específicamente los TLR4 y TLR2. Los TLR participan en el reconocimiento de patógenos y la defensa del huésped y desencadenan la inmunidad innata. El TLR2 es capaz de reconocer a los ácidos lipoteicoicos bacterianos y el TLR4 reconoce lipopolisacáridos (LPS) bacterianos. Ellos poseen un dominio extracelular y un dominio citoplasmático del

receptor Toll/IL-1 (TIR). En condiciones patológicas, los niveles de expresión de estos receptores aumentan a medida que reconocen a la HSP 60 extracelular liberada por estímulos de estrés. Esta interacción desencadena la producción de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6) mediante la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y la proteína de diferenciación mieloide 88 (MyD88)-p38, quienes a su vez inducen una regulación positiva de los niveles de expresión de TLR2 y TLR4 a través de la vía TLR4-MyD88-c-Jun N-terminal cinasas (JNK)/NF- κ B (14). De igual manera, la activación de los TLR4 y TLR2, puede generar el deterioro de la contractilidad de los miocitos ventriculares, a través de los productos de la vía de la NF- κ B (15).

Estrategias terapéuticas e inmunomoduladoras

Como se mencionó anteriormente, la HSP 60 extracelular (eucariota o procariota) puede desempeñar funciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, dependiendo de sus interacciones con los receptores de la superficie celular, incluidos los TLRs, aunque también puede unirse a otras proteínas durante una respuesta inmune para ayudar en su presentación a los linfocitos. Con base en la posibilidad de modular respuestas a nivel cardiovascular, donde el contexto proinflamatorio es preponderante, diversas estrategias se han estudiado para inducir una inmunidad selectiva con epítopos exclusivos de microorganismos, y así protegernos de amenazas infecciosas. Sin embargo, también se busca generar la tolerancia hacia aquellos epítopos compartidos para evitar la autoinmunidad. Estrategias de inmunomodulación usando toda la HSP 60 o péptidos de ésta han arrojado evidencia sobre las implicaciones biológicas y fisiopatológicas que estos elementos antigénicos tienen para orquestar respuestas celulares inmunitarias a favor y en contra del bienestar cardiovascular. Figura 3.

En este sentido, tradicionalmente se han realizado múltiples esfuerzos en el desarrollo de tratamientos para mejorar la supervivencia de pacientes con enfermedades cardiovasculares y aquellas mediadas a través de los TLRs. De los más de 100 ensayos clínicos terapéuticos, la mayoría no han logrado obtener resultados favorables en la modulación inflamatoria, siendo una de las explicaciones más aceptada, la perpetuación de una compleja interacción inmunoinflamatoria no regulada (16). Históricamente, las intervenciones antiinflamatorias han sido el enfoque principal para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, aquellas mediadas por la sepsis y el choque séptico, estimulando a la investigación y el desarrollo de nuevos antagonistas del TLR4 para amortiguar el entorno proinflamatorio, siendo TAK-242 y Eritoran dos moléculas reconocidas para tales fines. A pesar de su éxito para impedir el proceso de dimerización del complejo TLR4/MD2 en modelos murinos, al competir por el sitio o cavidad de unión de MD2, la molécula Eritoran no logró mejorar la

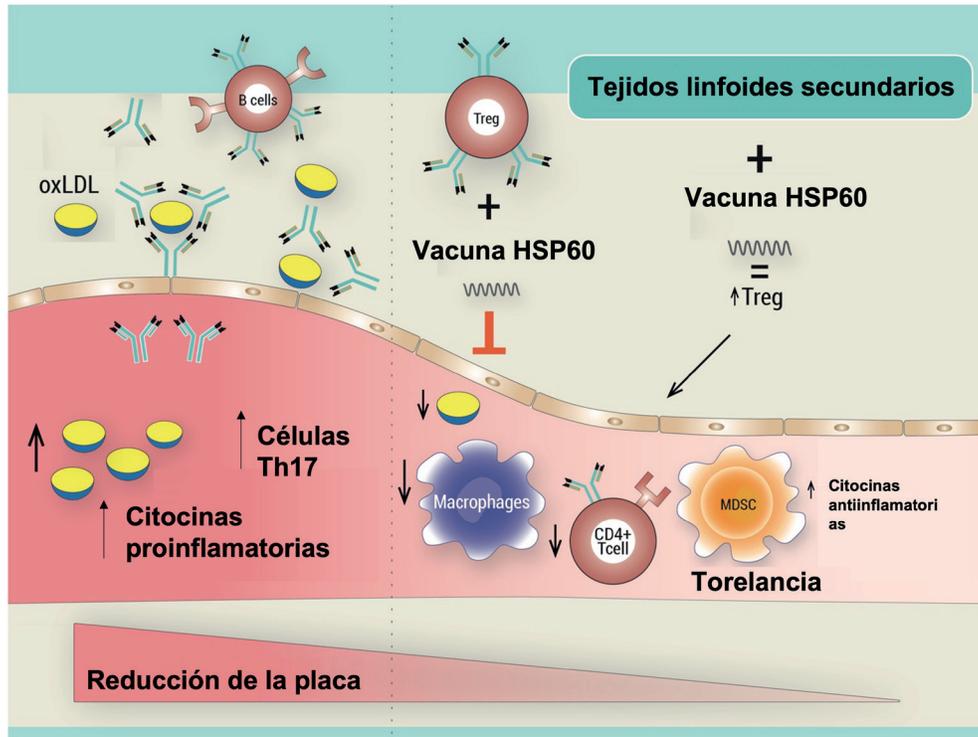


Figura 3. Vacunas con la proteína de choque térmico 60. Efecto dual de vacunas usando la HSP 60 por vía oral, subcutánea o intranasal sobre la progresión de la placa aterosclerótica (usando la proteína completa o sus péptidos derivados). Las vacunas con la HSP60 pueden reducir los depósitos o complejos de anticuerpos que en los vasos sanguíneos producen un ambiente proinflamatorio. Se observa que las vacunas peptídicas de la HSP 60 ejercen un mecanismo inmunomodulador para aumentar la actividad de las células T reguladoras (Tregs), una respuesta antiinflamatoria con la disminución en la producción de citocinas y la reducción en la actividad innata, la adaptativa, y una tolerancia que favorece a la reducción de placas. La línea punteada representa un ambiente proinflamatorio (a la izquierda) y uno antiinflamatorio (a la derecha) (modificado de (9)).

supervivencia en pacientes humanos con sepsis infectados por flora Gram-negativa (17). Con ello, esta perspectiva poco prometedora para el futuro cercano por el aumento de pacientes con enfermedades proinflamatorias y autoinmunes, los eventos inducidos por el cambio climático y el aumento de infecciones recurrentes con una mayor incidencia de sepsis y la resistencia emergente a los antibióticos, se hace plausible la necesidad de desarrollar fármacos inmunorreguladores o pensar en estrategias inmunomoduladoras con activadores proteicos dirigidos a los TLR4.

Con base en estas características y en el conocimiento de que los péptidos de la HSP60 actúan como adyuvantes y potentes activadores de los TLR4 en macrófagos y células dendríticas, pero también fungiendo como moléculas terapéuticas prometedoras para regular la disminución de la inflamación descontrolada (características de las enfermedades cardiovasculares, la artritis y la sepsis), ha sido necesaria la comprensión completa de las interacciones que gobiernan los procesos de activación o inhibición de estos receptores. Las herramientas bioinformáticas, como el acoplamiento molecular (*molecular docking*) y la dinámica molecular (*molecular dynamics*), arrojan nuevas perspectivas sobre tales situaciones y se vuelven herramientas útiles para la determinación de las interacciones clave entre las moléculas, como en nuestro caso, los péptidos de la HSP 60. En la última década, el

descubrimiento de fármacos simulados por computadora (*Computer-Aided Drug Discovery* o CADD, por sus siglas en inglés) ha permitido un progreso sustancial en el desarrollo de fármacos, moléculas pequeñas, péptidos o anticuerpos, reduciendo el lapso desde la identificación de los blancos moleculares y su optimización y aplicación biológica (18). Basado en el uso potencial de la HSP 60 y sus péptidos derivados como base para la activación de los PRRs y especialmente en terapias reguladoras de TLR4, se ha buscado una mayor comprensión de las interacciones que rigen la activación o inhibición de los TLR4 ejercida por los ligandos a explotar y así como comprender completamente su enfoque regulador. Vila-Casahonda y colaboradores (2022), tuvieron como objetivo acoplar un péptido de 15 residuos de aminoácidos derivado de la HSP60 (péptido-2) en el sitio de unión del lipopolisacárido (LPS, quien es el agonista o activador por excelencia del complejo de TLR4-MD2), mediante acoplamiento automático y la dinámica molecular con el objetivo de explorar la capacidad antagonista del TLR4 por este péptido (11). Como prueba de concepto, se exploró el efecto potencial de un péptido sintético en un modelo *in vitro* para explorar los efectos citoprotectores contra la citotoxicidad inducida por el LPS. Figuras 4 y 5.

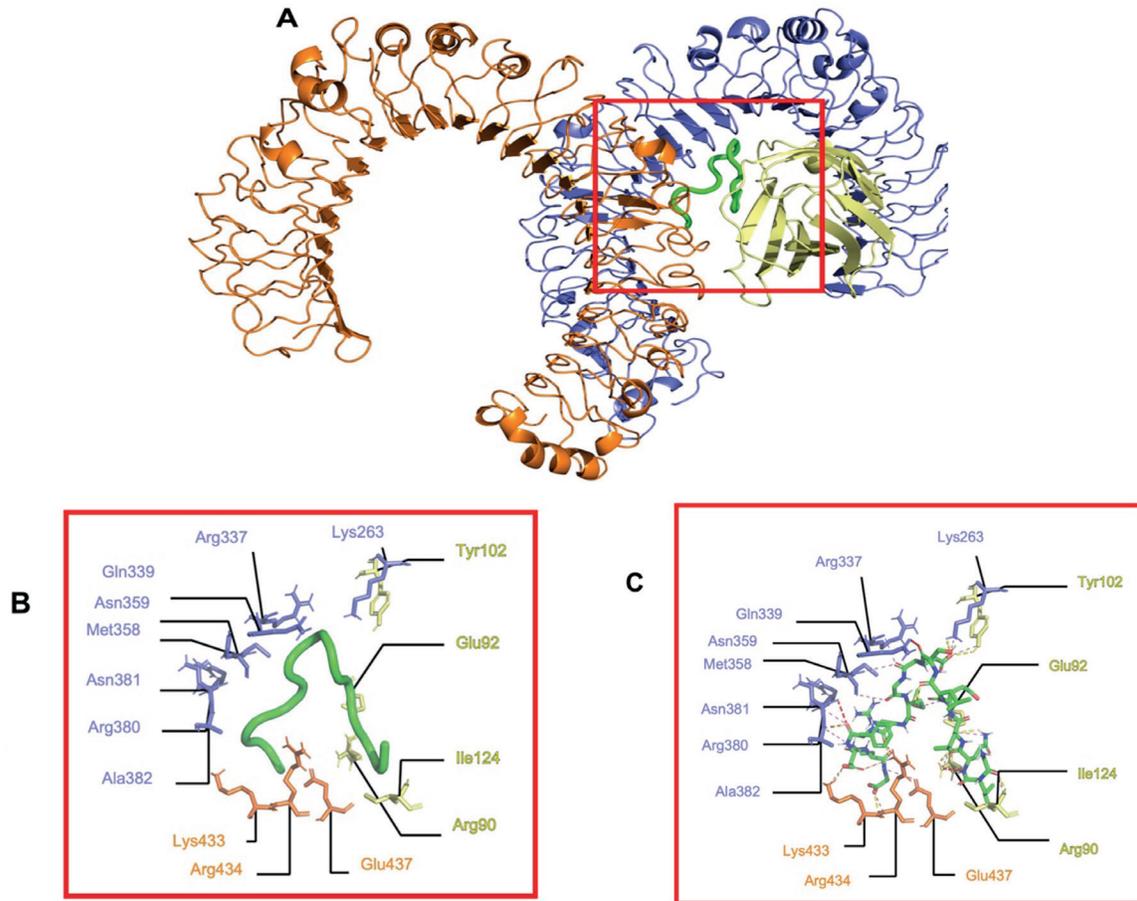


Figura 4. (A) Vista general del Péptido-2 (cuadrado rojo) acoplado en el complejo (TLR4/MD2) (el TLR4 se muestra en púrpura, el MD2 en amarillo y el TLR4 complementario en naranja). (B) Residuos detallados y coloreados conforme al segmento que pertenecen y que interactúan con el Péptido-2 (en verde). (C) Interacciones detalladas que ocurren entre los residuos y el Péptido-2 (mostradas en una representación en cilindros con átomos de carbono en verde, los átomos de oxígeno en rojo, átomos de hidrógeno en blanco y los átomos de nitrógeno en azul), los enlaces de hidrógeno se muestran como una línea discontinua amarilla, los choques electrónicos en una línea discontinua roja y las interacciones electrostáticas en una línea discontinua magenta. Las imágenes se obtuvieron con PyMOL y las interacciones fueron identificadas con el *Show Contacts plugin* (modificado de (11)).

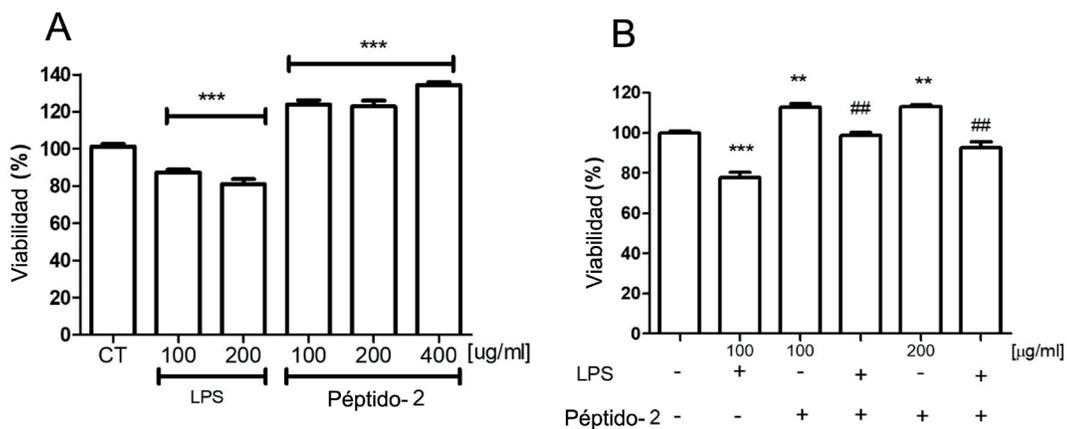


Figura 5. El Péptido-2 protege contra la reducción de la viabilidad celular en cardiomioblastos inducida por el LPS. (A) El tratamiento con LPS y el Péptido-2 indujeron una reducción y un aumento de la viabilidad celular, respectivamente (n=5 por grupo). ***p<0.001 vs. grupo control (CT). (B) El tratamiento con el Péptido-2 evitó la muerte celular inducida por el LPS (n=5 por grupo). ***p<0.0001 vs. grupo control; ## p<0.001 vs. LPS. Los valores son la media \pm SEM (modificado de (11)).

Los avances en el entendimiento de la HSP60 en las redes del sistema inmunológico sugieren que los péptidos derivados de esta proteína pueden ayudar a aliviar los efectos inflamatorios relacionados con la activación de los TLR4, ya que algunos de los péptidos derivados de esta proteína han mostrado tener efectos antiinflamatorios en las células somáticas con resultados prometedores en enfermedades autoinmunes y cardiovasculares; donde el TLR4 también presenta un papel clave [10]. Aunque se encuentra en etapas muy tempranas, los moduladores de los TLR4 siguen siendo un enfoque prometedor para el tratamiento de enfermedades proinflamatorias, siendo los tratamientos basados en péptidos un enfoque novedoso por sus beneficios sobre otras terapias altamente específicas (como la terapia con anticuerpos), por presentar una vida media más corta, un menor costo de producción y una mayor reproducibilidad.

Conclusiones

La HSP60 es una chaperona conservada evolutivamente y ha sido asociada, junto con otras chaperonas, a la manutención de la homeostasis celular, así como en el desarrollo de enfermedades inflamatorias cuando se detecta en la circulación, ya que es capaz de activar una cascada de señalización mediada por los TLR4 (19, 20). De manera interesante, los efectos moduladores de la inflamación con los péptidos derivados de la HSP60 han sido reportados en enfermedades mediadas por los TLR4, tales como cardiopatías y enfermedades autoinmunes, siendo parcialmente conocido el mecanismo y el efecto exacto ejercido sobre las células que expresan TLR4. Es de suma importancia el estudio y la comprensión de las chaperonas, en estos momentos donde el cambio climático, el aumento de contaminantes ambientales, el aumento de la población adulta mayor y el estrés global al que estamos expuestos, con el fin de encontrar estrategias que permitirán mantener el bienestar y disminuir afecciones en aquellos pacientes que las presenten.

Referencias

1. WHO CVD Risk Chart Working Group (2019) World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions. *The Lancet. Global health*. **7**, e1332–e1345
2. Bhaskaran, K., Hajat, S., Haines, A., Herrett, E., Wilkinson, P., and Smeeth, L. (2009) Effects of ambient temperature on the incidence of myocardial infarction. *Heart (British Cardiac Society)*. **95**, 1760–1769
3. Wang, Q., Li, C., Guo, Y., Barnett, A. G., Tong, S., Phung, D., Chu, C., Dear, K., Wang, X., and Huang, C. (2017) Environmental ambient temperature and blood pressure in adults: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Total. Environ.* **575**, 276–286
4. Sun, Q., Miao, C., Hanel, M., Borthwick, A. G. L., Duan, Q., Ji, D., and Li, H. (2019) Global heat stress on health, wildfires, and agricultural crops under different levels of climate warming. *Environ. Int.* **128**, 125–136
5. Lavados, P. M., Olavarría, V. V., and Hoffmeister, L. (2018) Ambient Temperature and Stroke Risk: Evidence Supporting a Short-Term Effect at a Population Level From Acute Environmental Exposures. *Stroke*. **49**, 255–261
6. Achebak, H., Devolder, D., and Ballester, J. (2019) Trends in temperature-related age-specific and sex-specific mortality from cardiovascular diseases in Spain: a national time-series analysis. *The Lancet. Planetary health*. **3**, e297–e306
7. Basu R. (2009) High ambient temperature and mortality: a review of epidemiologic studies from 2001 to 2008. *Environ. Health: Glob. Access Sci. Source*. **8**, 40
8. Krishnan-Sivadoss, I., Mijares-Rojas, I. A., Villarreal-Leal, R. A., Torre-Amione, G., Knowlton, A. A., and Guerrero-Beltrán, C. E. (2021) Heat shock protein 60 and cardiovascular diseases: An intricate love-hate story. *Med. Res. Rev.* **41**, 29–71
9. Guerrero-Beltrán, C. E., Mijares-Rojas, I. A., Salgado-Garza, G., Garay-Gutiérrez, N. F., & Carrión-Chavarría, B. (2021) Peptidic vaccines: The new cure for heart diseases?. *Pharmacol. Res.* **164**, 105372
10. Quintana, F. J., and Cohen, I. R. (2011) The HSP60 immune system network. *Trends Immunol.* **32**, 89–95
11. Vila-Casahonda, R. G., Lozano-Aponte, J., and Guerrero-Beltrán, C. E. (2022) HSP60-Derived Peptide as an LPS/TLR4 Modulator: An in silico Approach. *Front. Cardiovasc. Med.* **9**, 731376
12. Pockley, A. G., Wu, R., Lemne, C., Kiessling, R., de Faire, U., and Frostegård, J. (2000) Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*. **36**, 303–307
13. Grundtman, C., Kreutmayer, S. B., Almanzar, G., Wick, M. C., and Wick, G. (2011) Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc.* **31**, 960–968
14. Knowlton A. A. (2017) Paying for the Tolls: The High Cost of the Innate Immune System for the Cardiac Myocyte. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1003**, 17-34
15. Boyd, J. H., Mathur, S., Wang, Y., Bateman, R. M., and Walley, K. R. (2006) Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc. Res.* **72**, 384–393
16. Delano, M. J., and Ward, P. A. (2016) The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol. Rev.* **274**, 330–353
17. Kuzmich, N. N., Sivak, K. V., Chubarev, V. N., Porozov, Y. B., Savateeva-Lyubimova, T. N., and Peri, F. (2017) TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines*. **5**, 34
18. Ain, Q. U., Batool, M., and Choi, S. (2020) TLR4-Targeting Therapeutics: Structural Basis and Computer-Aided Drug Discovery Approaches. *Molecules (Basel, Switzerland)*. **25**, 627
19. Cappello, F., Marino Gammazza, A., Palumbo Piccionello, A., Campanella, C., Pace, A., Conway de Macario, E., and Macario, A. J. (2014) Hsp60 chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents. *Expert. Opin. Ther. Targets*. **18**, 185–208
20. Coelho, V., and Faria, A. M. (2012) HSP60: issues and insights on its therapeutic use as an immunoregulatory agent. *Front. Immunol.* **2**, 97



DR. C. ENRIQUE GUERRERO BELTRÁN
ORCID: 0000-0002-5001-0093

El Dr. Enrique Guerrero tiene una licenciatura en Biología Experimental por la Escuela de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) y una licenciatura en Educación Musical en Piano por la misma universidad. Es Maestro en Ciencias y Doctor en Ciencias por la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Realizó una estancia de investigación en The National Institutes of Health/ National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIH/ NIAAA) en Maryland (EEUU). Fue investigador posdoctoral en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Por otra parte, realizó una estancia posdoctoral en el grupo de Medicina Cardiovascular del Tecnológico de Monterrey. Fue Profesor-Posdoc dentro del grupo de enfoque en Medicina Molecular y fue Investigador Posdoctoral en el Department of Nanomedicine del Houston Methodist Research Institute, en Houston, Texas (EEUU). Actualmente, el Dr. Guerrero Beltrán es Profesor Investigador de tiempo completo en la Escuela de Medicina del Tecnológico de Monterrey y forma parte del grupo de investigación en Salud global y enfermedades emergentes.

El Dr. Enrique Guerrero es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (Nivel 1).

Ha publicado 26 artículos en revistas indizadas, con más de 850 citas. Es editor hoesped en la revista *Pharmaceutics* (editorial MDPI, Basel, Switzerland) (https://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics/special_issues/Treatment_Cardiovascular), ha sido revisor para la Editorial Planeta, entre otras revistas. Su labor como investigador versa sobre el estudio, *in vitro* e *in vivo*, de los mecanismos inmunomoduladores mediados por el uso de nanopartículas, proteínas y péptidos, así como de los efectos tóxicos y prooxidantes por el uso de nanomateriales y agentes químicos. De igual forma, ha estudiado los mecanismos antioxidantes, antiinflamatorios, antifibróticos y de muerte celular mediados por compuestos naturales en patologías cardiovasculares y renales.

Por último, ha trabajado intensamente en la labor de difusión y divulgación de las ciencias y las artes, con la generación y producción de cápsulas radiofónicas de ciencia, artículos de divulgación y videos sobre arte virreinal latinoamericano (<https://transferencia.tec.mx/> y <http://www.musicavirreinal.com>).



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 91-102

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Diseño y prueba de terapia génica con vectores adenovirales en tuberculosis experimental.

Design and testing of gene therapy with adenoviral vectors in experimental tuberculosis.

Mata Espinosa, Dulce Adriana^{1*}; Hernández Pando, Rogelio Enrique¹; Francisco Cruz, Alejandro¹; Hernández Bazán, Sujhey¹; Ramos Espinosa, Octavio¹ y Barrios Payán, Jorge Alberto¹.

¹Laboratorio de Patología, Sección Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

*Correspondencia: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez Sección XVI, Tlalpan, CDMX (México), C.P. 14080, Tel. (+52)5554870900 ext. 2194, dulce.matae@incmnsz.mx

Resumen

La tuberculosis es la enfermedad bacteriana que causa la mayor morbilidad y mortandad a nivel mundial, es considerada como una enfermedad de la pobreza por lo que tardará muchos años en controlarse y desaparecer de la faz de la tierra. Afecta principalmente a los pulmones, aunque puede afectar cualquier órgano del cuerpo. Existe vacuna, pero es poco eficiente, es posible curarla pero su tratamiento farmacológico es complejo pues consiste en ingerir 4 fármacos por largo tiempo, lo que causa desapego al tratamiento cuya principal consecuencia es la recidiva de la enfermedad y el surgimiento de bacterias multi-drogo resistentes condición que requiere la administración de más medicamentos por mayor tiempo. Es por lo tanto imperativo diseñar nuevos y más eficientes tratamientos, en los que se incluye la inmunoterapia génica. El objetivo del presente escrito es describir nuestro trabajo experimental utilizando diversos vectores adenovirales como una forma de terapia génica probada en modelos murinos de tuberculosis pulmonar, este tipo de tratamiento en general permite acortar significativamente el tiempo de tratamiento al coadyuvar con la antibioticoterapia convencional y con la de segunda línea para tratar la tuberculosis multi-drogo resistentes. Con el auge reciente que ha tenido la terapia génica, nuestra expectativa es que este tipo de terapia pueda ser en el futuro una alternativa en el tratamiento de la enfermedad humana.

Abstract

Tuberculosis is the bacterial disease that causes the greatest morbidity and mortality worldwide, it is considered a disease of poverty, which is why it will take many years to be controlled and disappear from the face of the earth. It mainly affects the lungs, although it can affect any organ. There is a vaccine but it is not efficient. There is an efficient treatment but its complex since it consists of 4 different drugs administrated for a long time, which causes compliance problems, recurrence and emergence of multi-drug resistant strains that requires the administration of more drugs for a longer time. It is therefore imperative to design new and more efficient treatments, including gene immunotherapy. The objective of this paper is to describe our experimental work using various adenoviral vectors as a form of gene therapy tested in murine models of pulmonary tuberculosis. This type of treatment allowed significant shorten of first and second line chemotherapy acting as coadjuvant. With the recent boom in gene therapy, our expectation is that this type of therapy may be an alternative in the treatment of human disease in the future.

Palabras clave: Terapia génica, adenovirus, tuberculosis pulmonar, tuberculosis latente, transmisibilidad.

Keywords: Gene therapy, adenovirus, pulmonary tuberculosis, latent tuberculosis, transmissibility.

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad producida por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), una bacteria ácido alcohol resistente que se ha adaptado exitosamente a su hospedero causando cada año más de 1.5 millones de muertes y 10 millones de casos nuevos. Además, un tercio de la población mundial está infectada sin manifestar enfermedad clínica, lo que se conoce como TB latente, la cual en el 10% de los casos se reactivará debido a diversos factores externos, tales como la vejez, infección por VIH, diabetes mellitus tipo 2 no controlada, insuficiencia renal crónica, artritis reumatoide tratada con bloqueadores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y tratamiento con inmunosupresores.

Existe tratamiento farmacológico eficiente para la TB activa, la cual consiste en la administración de cuatro antibióticos diferentes, isoniazida (INH), rifampicina (RIF), estreptomycin y etambutol por 4 a 6 meses. Debido a lo largo del tratamiento es común el desapego, la toxicidad y la emergencia de bacterias multi-drogo-resistentes (MDR). El tratamiento de la TB-MDR consiste en la administración de hasta ocho antibióticos de segunda línea por 12 y hasta 18 meses, por lo tanto, este es un tratamiento más complejo, largo, de mayor costo y toxicidad. Por estos motivos es de gran importancia diseñar alternativas terapéuticas que permitan acortar el tratamiento, una de las cuales es potenciar la respuesta inmunológica protectora lo que se conoce como inmunoterapia (1).

Adenovirus

Hay más de 103 serotipos de adenovirus humanos, pero el tipo 5 es el más común y más estudiado como vector de transferencia génica, tanto en enfermedades neoplásicas como infecciosas. Los adenovirus pertenecen a la familia Adenoviridae, género Mastadenovirus. Son virus no envueltos con cápside icosaédrica y su DNA es de doble cadena de 26 a 45 kb, codifican para 40 proteínas clasificadas en tempranas (*early*) y tardías (*late*). Los genes *early* E1A, E1B, E2 y E4 son expresados antes de la replicación de DNA, y los genes *late* (L1-L5), codifican para la base pentona, al hexón y a las fibras que constituyen la estructura de la cápside; los genes tardíos codifican también para proteínas del núcleo como la proteína VII, proteasa, etc. El ciclo de vida del virus incluye la replicación del DNA, la expresión génica y formación del virión, todo ello ocurre dentro del núcleo.

Los receptores de los adenovirus varían entre las especies, el receptor de adenovirus y el coxackievirus denominado CAR, representa la principal ruta de entrada en la célula hospedera, pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y es requerido para que el virus se una a la membrana plasmática

(2). La expresión de CAR en muchas células confiere un alto tropismo a los adenovirus, como sucede en hepatocitos, mioblastos, células bronquiales, células epiteliales y endoteliales que son muy permisibles a la infección por adenovirus porque tienen CAR en sus membranas (3).

Los adenovirus no causan enfermedades graves en personas sanas, pero si en personas con inmunodeficiencias, como pacientes VIH positivos (4). Los vectores adenovirales han tenido gran éxito como agentes vacunales debido a que se les pueden insertar DNA complementario con tamaño mayor de 8 Kb, se generan grandes cantidades *in vitro* y no requieren de un adyuvante extra, por sí mismos generan una intensa respuesta inmune.

El uso de adenovirus como vectores genéticos tiene varias ventajas, como lo es su alta seguridad debido a que los adenovirus no se replican y por ende la producción de la proteína es transitoria (por dos o tres semanas) pero suficiente para ejercer su actividad biológica. Además, los adenovirus son poco inmunogénicos debido a la ausencia de los genes tempranos (*early* 1 y 3) y producen ligera inflamación en pulmones e hígado (5), estos vectores virales tienen ligandos para receptores específicos que se expresan sobre todo en el epitelio bronquial por lo que son agentes ideales para tratar enfermedades pulmonares. La producción de los adenovirus es de menor costo que las proteínas recombinantes, puesto que estas se degradan rápidamente y se tienen que administrar con frecuencia; mientras que las proteínas producidas por las células infectadas con los adenovirus se producen constantemente, manteniendo su efecto de forma más perdurable después de una sola administración del vector viral (4).

Los pasos que se siguen para construir y aplicar los vectores adenovirales son: primero construir el vector adenoviral con el gen de interés, posteriormente determinar su concentración y actividad biológica evaluada en ensayos *in vitro*. Determinar la cinética de expresión genética de la proteína recombinante *in vivo*, después administrar los adenovirus directamente en el pulmón por inyección intratraqueal en dosis diferentes para determinar la más eficiente y el tiempo de expresión del gen transfectado, así como analizar el daño histológico producido. Finalmente se evalúa el efecto terapéutico del adenovirus en los diferentes modelos murinos de TB (5).

En algunos casos se requiere una sola administración para obtener el efecto terapéutico, en otros casos de varias aplicaciones, en la mayoría de los ensayos se ha utilizado la vía intratraqueal pero también se utiliza la intranasal que es una vía poco invasiva y de gran potencial (5). Se han utilizado también los vectores adenovirales para la expresión de antígenos micobacterianos principalmente como vacunas (6), en nuestro laboratorio los hemos utilizado para sobreexpresar proteínas esenciales en el control de la TB en sus diferentes

formas como una modalidad inmunoterapéutica.

La terapia génica con adenovirus recombinantes que portan genes que codifican diversos factores inmunológicos que participan en la eliminación de las bacterias es una forma de inmunoterapia, que se basa en la terapia génica. Nuestro grupo ha trabajado desde hace varios años esta forma de inmunoterapia, probando su eficiencia en modelos experimentales murinos de TB activa, TB latente y de transmisibilidad o contagio activo a convivientes cercanos. A continuación, se describen los aspectos básicos de la terapia génica y los resultados de nuestro trabajo en TB experimental.

Modelos murinos de tuberculosis

Para las dos modalidades principales de la TB que son la enfermedad progresiva y la infección latente se cuenta con dos modelos establecidos en ratones BALB/c; otro aspecto importante en la TB es la infección de sujetos que conviven cercanamente con pacientes tuberculosos, para lo cual también se tiene un modelo experimental (7) y en todos ellos se ha evaluado el efecto terapéutico o preventivo de la terapia génica. A continuación, se describen de forma resumida estos modelos murinos.

A. El modelo murino de TB pulmonar progresiva consiste en infectar por inyección intratraqueal ratones machos de la cepa BALB/c con 250,000 bacterias vivas (cepa de referencia drogo sensible H37Rv o cepa MDR CIBIN99), con esta dosis alta de bacterias se produce enfermedad pulmonar progresiva (8). Este modelo se caracteriza por presentar 2 fases: la fase temprana y la fase tardía, cabe mencionar que es la misma vía de entrada por la cual la micobacteria infecta al humano.

1) La fase temprana está caracterizada por el control temporal de la infección mediado por la inmunidad innata representada principalmente por la producción de péptidos antimicrobianos (catelicidina LL37, beta-defensinas) y por la inmunidad adquirida mediada por linfocitos T cooperadores de tipo 1 (Th1) y macrófagos activados M1 productores de citocinas proinflamatorias como TNF α , interferón gamma (IFN γ), interleucina 12 (IL12) y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). Hay formación de granulomas a partir del día 14 e infiltrado inflamatorio peri-vascular, peri-bronquial y en el intersticio alveolo-capilar, esta fase abarca el primer mes de infección. En este modelo si los granulomas son grandes y numerosos indican que hay control de la infección, en cambio pocos granulomas y pequeños indican que no se está controlando la bacteria.

2) La fase tardía está caracterizada por un aumento progresivo en la carga bacteriana, emergencia y predominio de linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2) sobre los Th1, presencia de macrófagos activados por vía alterna M2, disminución de péptidos antimicrobianos, citocinas pro-inflamatorias (TNF α , IL1 α , IFN γ) e iNOS, aumento de citocinas antiinflamatorias como factor de crecimiento transformante beta (TGF β), interleucina 10 (IL10), interleucina 4 (IL4), neumonía y fibrosis intersticial extensa que conduce a la muerte del ratón,

y granulomas pequeños (9).

B. Otra forma de TB es la infección latente, la cual es asintomática clínicamente y no es transmisible debido a que las bacterias permanecen viables, pero en un estado de baja actividad metabólica y reproductiva que se conoce como estado latente o quiescente en diversos tejidos por el resto de la vida del individuo. Este estado establece un equilibrio en el cual las bacterias no producen daño tisular y el sistema inmunológico no las elimina. Nuestro grupo de trabajo estableció un modelo murino similar a la infección latente que consiste en la infección intratraqueal con una pequeña carga bacteriana (1000 bacterias) en ratones híbridos F1 de la cruce de las cepas C57Bl/DBA, en este modelo durante siete meses después de la infección no se produce pérdida de peso ni neumonía, existen granulomas, focos ocasionales y pequeños de alveolitis (10) con alta expresión de péptidos antimicrobianos (11), TNF α , IFN γ e iNOS. Si a estos animales se les administra corticosterona en el agua de bebida se produce inmunosupresión y en consecuencia se reactiva la infección, caracterizado por aumento de la carga bacilar, aparición de neumonía y disminución acentuada de los factores de protección inmunológica como las beta-defensinas, TNF α , IFN γ e iNOS.

Terapia génica de la TB

El conocimiento de la respuesta inmune protectora y no protectora durante el curso de la TB permite interceder terapéuticamente en el curso de la enfermedad, aportando factores protectores cuando estos se producen poco o suprimiendo factores deletéreos que bloquean la inmunidad protectora (12).

Esta intervención en la respuesta inmune permite eliminar eficientemente al agente infeccioso y es la base de la inmunoterapia. A continuación, se describe este tipo de intervención terapéutica utilizando vectores adenovirales que portan genes que codifican factores inmunológicos de importancia en el control del crecimiento y erradicación de las micobacterias, lo que constituye la terapia génica para tratar la TB activa y para prevenir la reactivación de la TB latente y la transmisión o contagio a convivientes cercanos de pacientes tuberculosos.

Terapia con adenovirus recombinantes de interferón gamma, AdIFN γ

IFN γ es una citocina muy importante en el control de la TB, activa a macrófagos e induce la expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad clase II potenciando la presentación de antígenos a las células T, además induce otras citocinas proinflamatorias como TNF α y su receptor, induce la producción de la enzima iNOS, todo ello con el objetivo de controlar la infección por micobacterias.

Por sus múltiples funciones bactericidas, fue la primera forma de terapia génica en ser utilizada en el modelo murino de

TB progresiva. En el día 60 post-infección cuando la TB es avanzada debido a que produce extensa neumonía con elevada carga bacilar, se administró una sola dosis del AdIFN γ , en ratones infectados con H37Rv y con la cepa MDR CIBIN99, con este tratamiento se produjo disminución significativa de la carga bacteriana y neumonía en ambas cepas.

Cuando el AdIFN γ se administró en combinación con el tratamiento convencional isoniazida (INH), pirazinamida (PIR) y rifampicina (RIF) se redujo significativamente la carga bacteriana y la extensión de la neumonía, en comparación con animales tratados solo con los antibióticos, lo cual indica que la terapia génica acorta significativamente el tiempo de la antibioticoterapia (5).

El tratamiento con el adenovirus recombinante indujo sobre expresión de IFN γ , con niveles elevados de TNF α y CCL2 una quimiocina específica para reclutar linfocitos que probablemente contribuyeron en la formación de granulomas de mayor tamaño, lo que correlaciona con un mejor control de la infección en este modelo de TB progresiva.

La administración del AdIFN γ en animales sanos produjo eficiente expresión de IFN γ en las células epiteliales bronquiales y macrófagos, con inflamación leve en los pulmones (perivascular y bronquial) y en el hígado (áreas porta), lo cual confirma la alta eficiencia del vector adenoviral para infectar el pulmón y expresar el gen recombinante (Figura 1) (5).

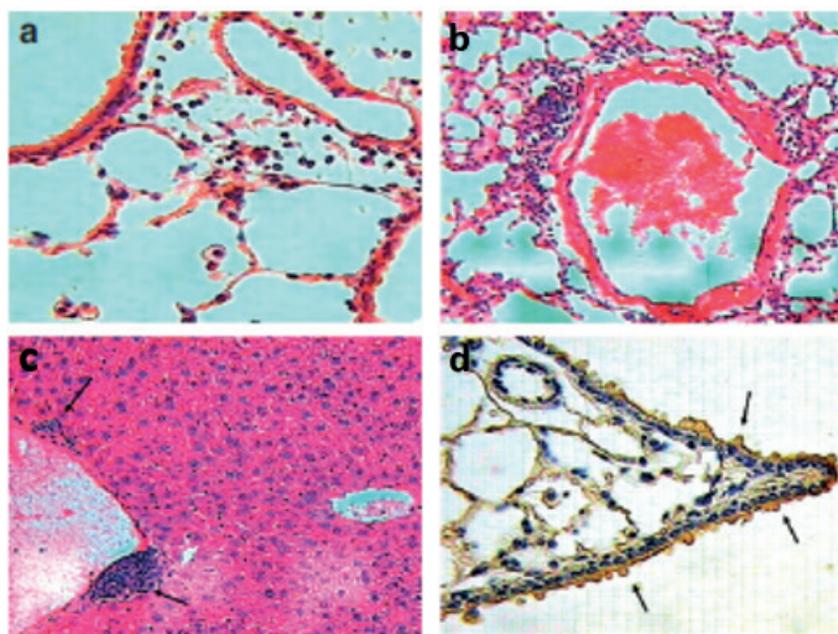


Figura 1. Efecto de la administración intratraqueal de AdIFN γ en ratones sanos. (a) Micrografía representativa del pulmón un día después de ser infectado con AdIFN γ , existe infiltrado inflamatorio leve alrededor de una vénula. (b) Después de 21 días de la administración de los adenovirus se produce inflamación moderada alrededor de vasos sanguíneos. (c) El hígado muestra inflamación focal en áreas porta. (d) Las células del epitelio bronquial (flechas) muestran intensa inmunotinción para IFN γ , lo que confirma que estas son las células principalmente infectadas por los adenovirus recombinantes y que estas expresan eficientemente esta citocina. (Tomada y modificada de la referencia 5).

Terapia con adenovirus recombinantes del factor estimulante de granulocitos y macrófagos AdGM-CSF

El factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es producido por una amplia variedad de células como macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, mesoteliales y epiteliales (13).

Dentro de sus características induce la diferenciación, proliferación, activación de macrófagos y células dendríticas las cuales son necesarias para la activación de linfocitos T citotóxicos, células Th1 y particularmente en las células dendríticas. Los ratones KO para GM-CSF son más susceptibles a la infección por Mtb, debido a que son deficientes en la formación de granulomas y no pueden

eliminar eficientemente a las micobacterias (14). GM-CSF ha sido utilizado para tratar otras enfermedades infecciosas ya que aumenta el número de células presentadoras de antígeno, así como la producción de IL12, IFN γ , anticuerpos y respuesta citotóxica (15).

Una de las características de nuestro modelo de TB progresiva es el retraso de la activación de las células dendríticas, por lo cual las bacterias pueden adaptarse mejor sin ser eliminadas durante la infección temprana (16). Por este motivo se evaluó el efecto profiláctico de los AdGM-CSF, administrándolos un día antes de la infección con bacterias de la cepa drogosensible de Mtb H37Rv (17). Con este tratamiento la citometría de flujo mostró significativo adelanto de la presencia de células dendríticas activadas (MHC II $^+$, CD11c $^+$, CD86 $^+$) (Figura 2),

lo que evitó el incremento en la carga bacteriana con respecto a los ratones control que recibieron el adenovirus vacío (Figura 3a).

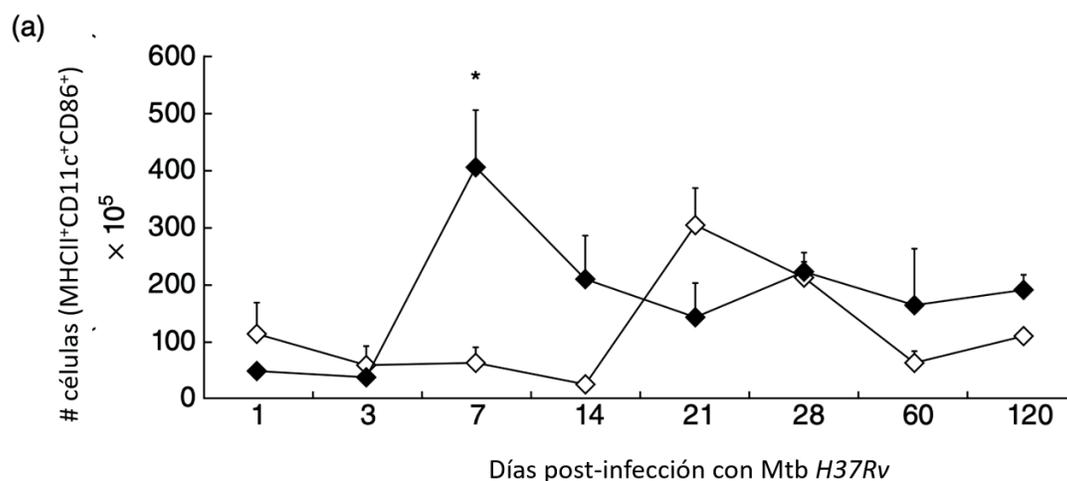


Figura 2. Efecto de la administración de AdGM-CSF un día antes de la infección con Mtb en la cinética de las células dendríticas activadas (MHC II⁺, CD11c⁺, CD86⁺). Una sola administración de AdGM-CSF (rombos negros) el día previo a la infección adelantó e incrementó las células dendríticas en comparación con los animales control que recibieron los adenovirus vacíos (rombos blancos). (Tomada y modificada de la referencia 17).

La expresión de AdGM-CSF también evitó que aumentara la neumonía, además de que indujo aumento en el número de granulomas y el área de los mismos, lo que en este modelo indica buena protección (Figura 3).

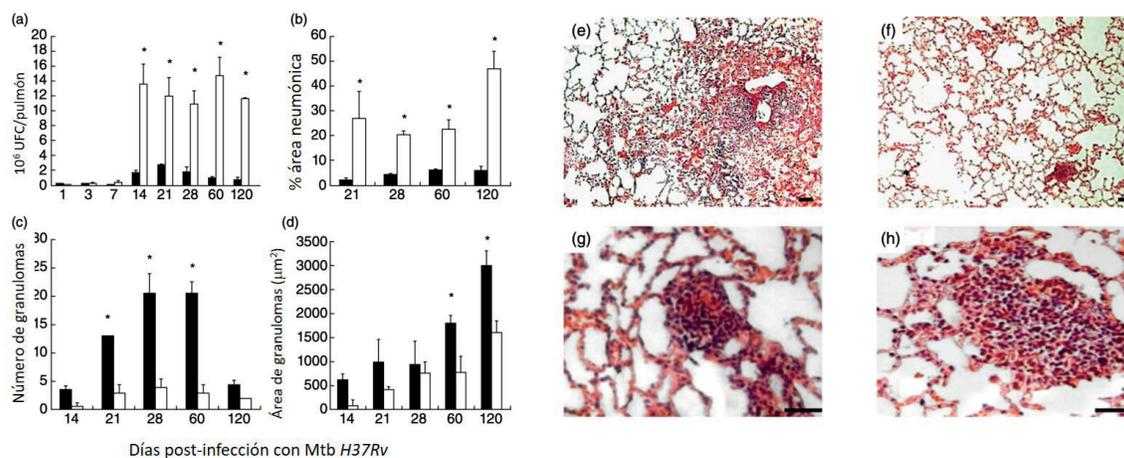


Figura 3. Efecto del tratamiento con AdGM-CSF el día previo de la infección con Mtb. (a) Carga bacteriana determinada por conteo de unidades formadoras de colonia en homogenizados pulmonares, los animales tratados (barras negras) muestran decremento significativo de la carga bacilar en comparación con los animales control (barras blancas) tratados con el adenovirus vacío (Add170-3). (b) En comparación con los animales control, los tratados con los adenovirus recombinantes muestran menor porcentaje de neumonía, con incremento del número (c) y área (d) de los granulomas. Micrografías representativas del pulmón de ratones control que muestran extensa neumonía (e) y granulomas pequeños (g), en comparación con los ratones tratados con AdGM-CSF que muestran muy poca neumonía (f) y granulomas más grandes (h). (Tomada y modificada de la referencia 17).

En nuestro modelo de TB activa durante la fase avanzada cuando hay extensa neumonía y alta carga bacteriana también existe disminución acentuada de las células dendríticas, por lo que también se determinó el efecto del AdGM-CSF durante esta fase. Una sola dosis de AdGM-CSF en el día 60 de la infección disminuyó significativamente la carga bacilar en comparación con los ratones que recibieron los

adenovirus vacíos, tanto en animales infectados con bacterias drogo sensibles como MDR y los AdGM-CSF también acortaron el tiempo de tratamiento cuando se administraron en combinación con antibióticos (18).

La TB latente afecta a un tercio de la población mundial, es decir dos billones de personas en el mundo tienen esta condición, lo que constituye el reservorio más grande de

Mtb y se calcula que el 10% de estos sujetos infectados pueden sufrir reactivación desarrollando TB activa debido a la coexistencia de enfermedades que deprimen al sistema inmunológico, como la diabetes mellitus, enfermedades renales crónicas, infección por VIH, entre otras (19). Por estos motivos, un aspecto de gran importancia es desarrollar terapias que eviten la reactivación de la TB latente. En un modelo murino similar a la TB latente evaluamos el AdGM-CSF en su capacidad para evitar que la TB se reactivara por la administración de corticosterona un potente inmunosupresor. La administración de AdGM-CSF en una sola dosis en ratones con TB latente sometidos posteriormente a inmunosupresión inducida por la administración de corticosterona durante un mes, se observó que el tratamiento con AdGM-CSF evitó el crecimiento de bacterias en cultivo (Figura 4a) y la extensión de la neumonía fue menor en comparación con los ratones que recibieron el adenovirus vacío (Figura 4b), lo cual demuestra que este tratamiento previene la reactivación de la TB latente experimental.

La TB es una enfermedad extremadamente contagiosa, por lo que los convivientes cercanos a pacientes con TB activa tienen un riesgo alto de infectarse y desarrollar TB progresiva, lo cual es más frecuente en los asilos y cárceles, así como en pacientes con inmunodeficiencias como los infectados con VIH. En nuestro laboratorio establecimos un modelo que reproduce esta condición, ratones con TB activa inducida por la infección con la cepa de referencia H37Rv o con un aislado clínico hipervirulento y altamente contagioso conviven con un grupo de ratones sanos en el mismo microaislador. En este modelo experimental de transmisibilidad probamos la eficiencia del AdGM-CSF, comparado ratones normales tratados con AdGM-CSF con ratones control negativos que recibieron adenovirus vacíos (Add170) y controles positivos tratados con INH. Los resultados mostraron que los AdGM-CSF y la INH evitaron que los ratones sanos se infecten con H37Rv (Figura 4c) o con la cepa Beijing 9001000 (Figura 4d) aislado clínico hipervirulento después de 2 meses de convivencia con los ratones enfermos.

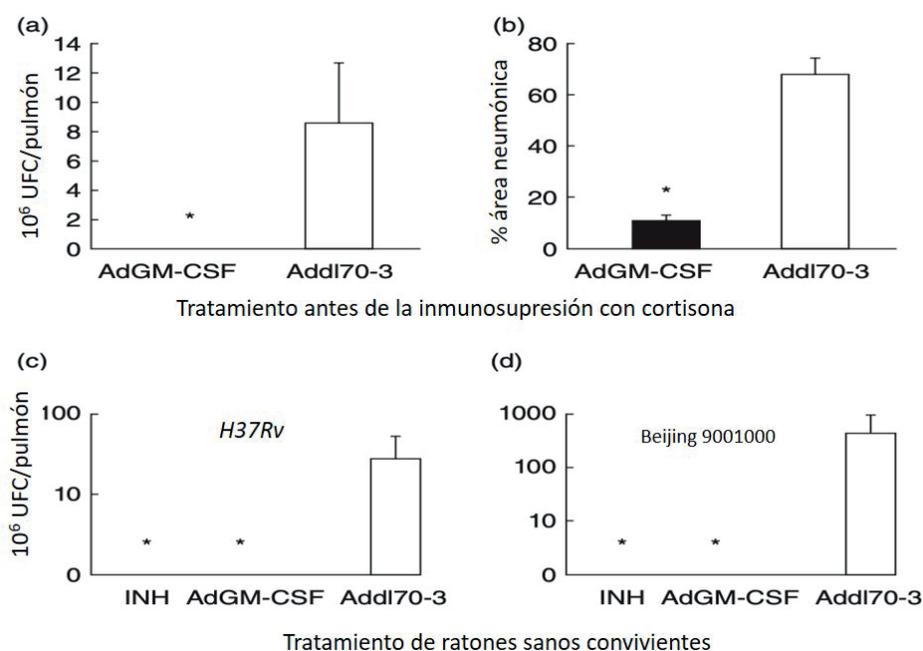


Figura 4. Efecto de la administración de AdGM-CSF en los modelos murinos de TB latente y transmisibilidad. Comparados con los ratones que recibieron los adenovirus vacíos (Add170-3), la administración de AdGM-CSF evitó la reactivación de la infección latente, como lo demuestra (a) la ausencia de UFC y (b) la menor área pulmonar afectada por neumonía en los pulmones de ratones con infección latente sometidos a inmunosupresión. La administración de AdGM-CSF o isoniazida (INH) también evitó el contagio de ratones sanos convivientes con ratones tuberculosos con una cepa sensible a fármacos H37Rv (c) y la cepa Beijing 9001000 (d). (Tomada y modificada de la referencia 17).

La administración de los AdGM-CSF inducen la expresión de citocinas proinflamatorias como IL12, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ y de la enzima iNOS, que son factores esenciales en la protección contra la TB (Figura 5), esta actividad es en parte producida por la gran eficiencia que tiene el GM-CSF en inducir la activación de las células dendríticas además de ser un factor esencial en la maduración de los macrófagos alveolares (20).

Terapia con adenovirus recombinantes de interleucina 12, AdIL12.

La interleucina 12 (IL12) tiene dos subunidades p35 y p40, es producida por macrófagos, células NK, dendríticas, células B en respuesta a patógenos o por estimulación de otras citocinas. Es bien conocido su papel para convertir

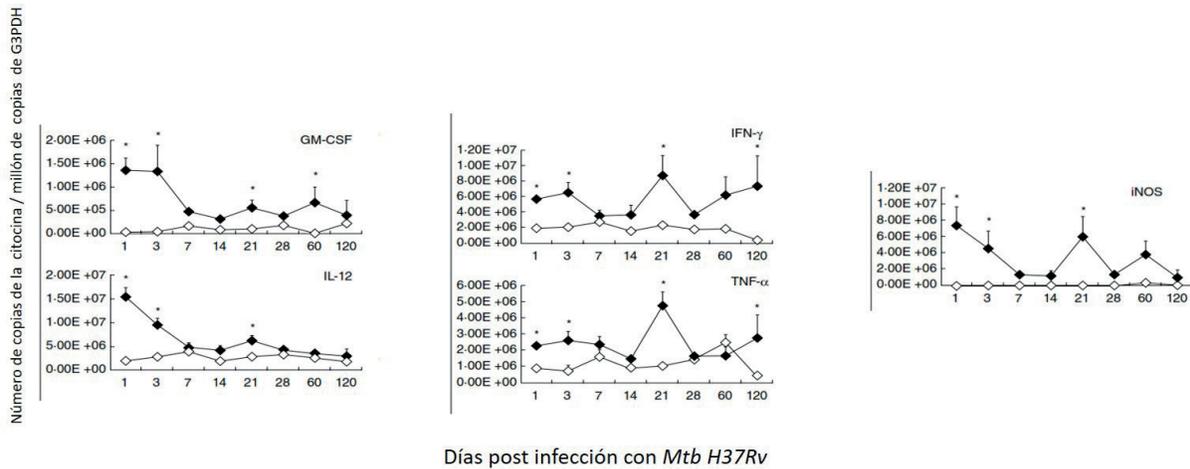


Figura 5. La administración de AdGM-CSF induce la expresión de citocinas proinflamatorias como IL12, IFN γ , TNF α y de la enzima iNOS. Por PCR-tiempo real se determinó la expresión de GM-CSF, IL12, IFN γ , TNF α y de la enzima iNOS en los ratones tratados con el AdGM-CSF (rombos negros) y adenovirus vacío AdIL12-3 (rombos blancos). (Tomada y modificada de la referencia 17).

células T inmaduras en células T efectoras, es un inductor de la migración de las células dendríticas y un inhibidor de las citocinas antiinflamatorias, pero su actividad más destacada es que es un factor esencial en el desarrollo de la respuesta Th1 (21), lo cual la convierte en un candidato ideal para evaluar su efecto terapéutico en nuestros modelos de TB. El adenovirus AdIL12 se administró en 2 tiempos diferentes del modelo de tuberculosis progresiva, con el objetivo de

evaluar su efecto profiláctico y terapéutico. Para evaluar su efecto profiláctico, los AdIL-12 se administraron un día antes de la infección con la cepa de referencia H37Rv (22). Con respecto a los animales que recibieron el adenovirus vacío (AdCT), los ratones tratados con AdIL12 mostraron disminución significativa de la carga bacteriana, menor neumonía y más alta expresión de IFN γ , TNF α , e iNOS (Figura 6).

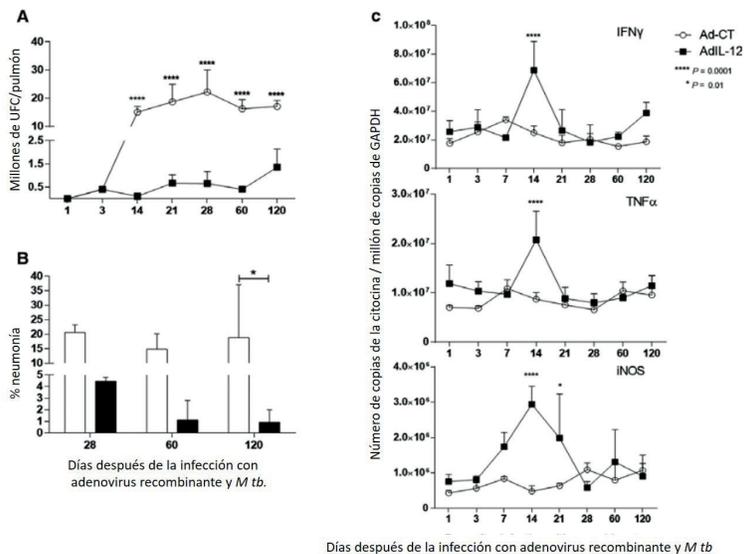


Figura 6. Efecto profiláctico de AdIL12 en los pulmones de ratones infectados con MTB H37Rv. (A) Ratones tratados con AdIL12 un día antes de ser infectados con MTB H37Rv muestran disminución significativa de la carga bacteriana (cuadrados negros), en comparación con los animales control (AdCT, círculos blancos). (B) El porcentaje de neumonía en los ratones tratados con AdIL12 (barras negras) es menor al de los ratones tratados con adenovirus vacío AdCT (barras blancas) (C) La expresión de IFN γ , TNF α y de la enzima iNOS determinada por RT-PCR es significativamente mayor dos semanas después de la infección. (Tomada y modificada de la referencia 22).

Debido al efecto profiláctico obtenido con AdIL-12, se evaluó su efecto terapéutico por lo que se administraron 4 dosis vía intranasal en la fase tardía de la infección, 60 días después de haber sido infectados cuando la carga bacteriana y neumonía son altas, el tratamiento con AdIL12 logró disminuir la carga bacilar (Figura 7A). El AdIL-12 se probó también en

el modelo de convivencia, una sola dosis de AdIL12 se les administró vía intratraqueal a los ratones sanos convivientes con ratones infectados con una cepa de micobacterias altamente virulenta y transmisible (cepa Beijing 9001000). Los ratones convivientes mostraron menor cantidad de UFCs (Figura7B) con respecto a los que recibieron el Ad-CT (22).

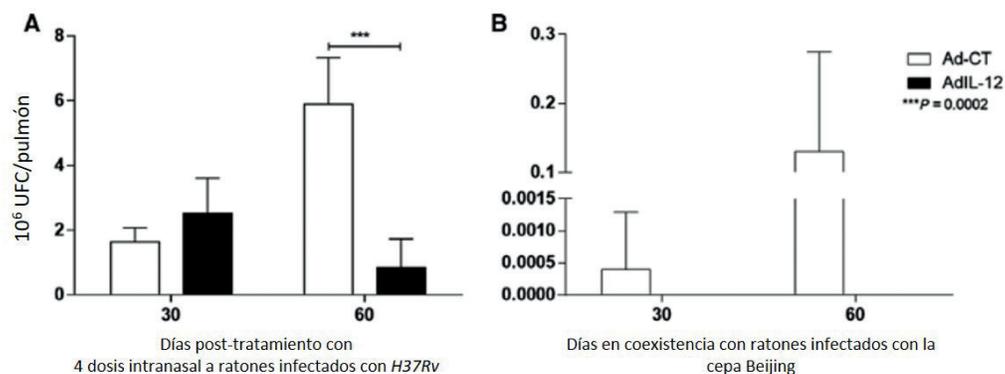


Figura 7. Efecto del tratamiento con AdIL12 en la tuberculosis progresiva avanzada y transmisibilidad. En comparación con los animales control que recibieron el adenovirus vacío (Ad-CT, barras blancas), los ratones tratados con los AdIL-12 (barras negras) mostraron disminución de la carga bacilar (A). La administración de AdIL-12 evitó el contagio de ratones sanos convivientes con ratones tuberculosos infectados con la cepa Beijing 9001000 (B). (Tomada y modificada de la referencia 22).

Terapia con adenovirus recombinantes con osteopontina, AdOPN

La osteopontina (OPN) es una proteína involucrada en la biomineralización, cicatrización de heridas e inflamación, es producida por macrófagos y células T, induce quimiotaxis, maduración de células dendríticas y activación de células T que expresan IFN γ e IL12 citocinas que promueven hacia la polarización Th1 que es una respuesta protectora esencial en TB.

El AdOPN se administró en la fase tardía de la TB progresiva en ratones infectados con la cepa MDR de Mtb CIBIN99,

este tratamiento produjo disminución significativa de la carga bacteriana y de la neumonía a partir del día 14, con aumento del área de granulomas (Figura 8), lo que muestra control eficiente de la infección micobacteriana. La cinética de expresión de citocinas determinada por PCR en tiempo real y por inmunohistoquímica, mostró que OPN se expresa en el día 3 y 28 dentro células epiteliales bronquiales y macrófagos activados dentro de granulomas. El tratamiento con AdOPN indujo mayor expresión de IL12 desde el día 14, mayor expresión de IFN γ , TNF α e IL17, con lo cual se obtuvo un eficiente control de la infección micobacteriana (23).

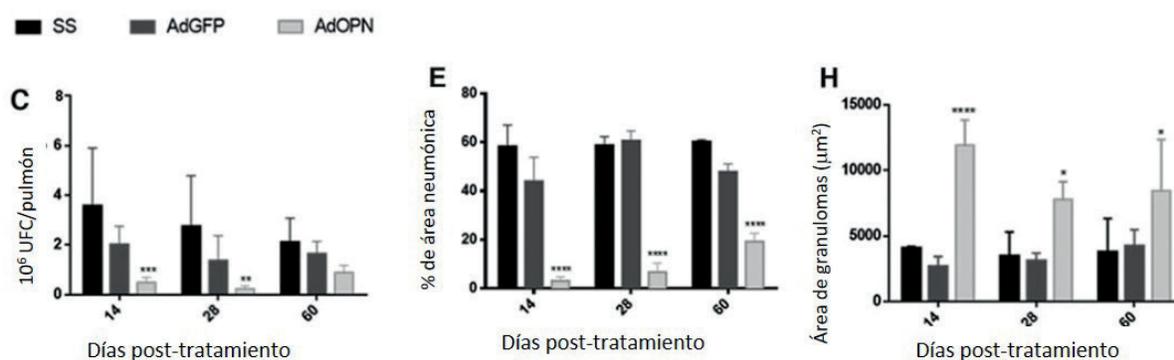


Figura 8. Efecto del tratamiento con AdOPN en la tuberculosis progresiva avanzada producida por la cepa MDR CIBIN99. En comparación con los animales control que recibieron el vehículo (solución salina SS, barras negras) o el adenovirus que expresa la proteína verde fluorescente (AdGFP, barra gris oscuro), los ratones tratados con los AdOPN (barras grises claras) mostraron disminución de la carga bacilar (C) y neumonía (E), con granulomas más grandes (H). (Tomada y modificada de la referencia 23).

Terapia con adenovirus recombinantes que expresan los péptidos antimicrobianos catelicidina (AdLL37) y beta-defensina 3 (Ad β DEF) y la citocina factor de necrosis tumoral (AdTNF α).

En la primo-infección tuberculosa las bacterias se eliminan eficientemente, solo el 5% de los casos desarrolla TB activa. No se conoce con precisión la causa de esto, pero es probable que lo sea la eficiencia de la inmunidad innata. Mtb ingresa por el sistema respiratorio y la primera línea de defensa son el epitelio respiratorio y los macrófagos alveolares, cuyas principales actividades protectoras son la fagocitosis y la producción de los péptidos antimicrobianos (PAM) defensinas y catelicidinas (11). Los PAM son moléculas pequeñas y catiónicas que forman poros en las membranas de los microorganismos provocándoles lisis, además son quimiotácticas y reguladoras de células inmunológicas, por lo que moléculas activadoras de macrófagos y PAMs tienen

gran potencial en inmunoterapia.

Los niveles altos de los PAMs beta defensina (β DEF) y catelicidina (LL37) también son de gran relevancia para mantener en estado de quiescencia a la micobacteria (24).

En nuestros modelos murinos de TB pulmonar progresiva y latente, hemos observado que la abundancia de macrófagos activados M1 y PAMs contribuye en el control inicial de la infección (9,25,26).

En contraste, en la etapa avanzada de la TB estos disminuyen, lo cual contribuye en aumentar la proliferación bacteriana y el daño tisular (neumonía). Durante esta fase progresiva hemos estudiado el efecto terapéutico de adenovirus recombinantes que expresan PAMs. En todos estos estudios se redujo significativamente la carga bacilar en ratones con TB drogossensible (Figura 9A) y un aislado clínico drogo resistente MDR (Figura 9B), además se acortó el tiempo de tratamiento con antibióticos (27).

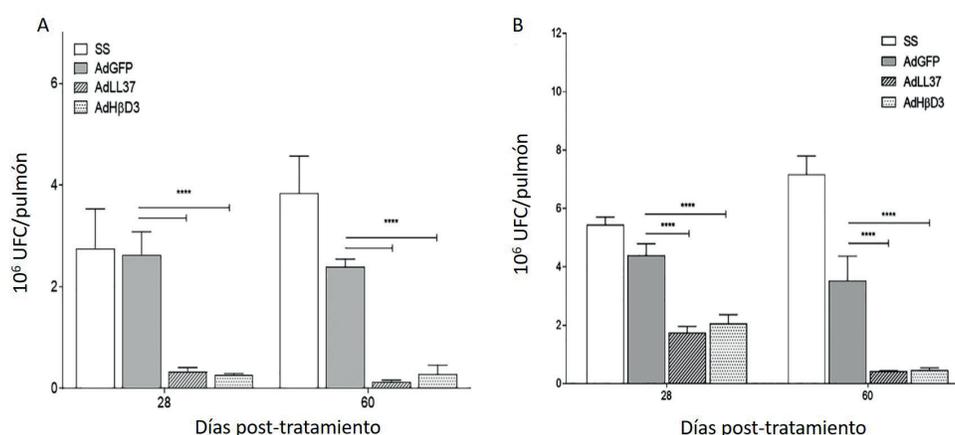


Figura 9. Efecto del tratamiento con péptidos antimicrobianos (AdLL37) y beta-defensina 3 (Ad β DEF) en la tuberculosis progresiva avanzada producida por la cepa H37Rv drogossensible y el aislado clínico MDR drogoresistente. En comparación con los animales control que recibieron el vehículo (solución salina SS, barra blanca) o el adenovirus que expresa la proteína verde fluorescente (AdGFP, barra gris), los ratones tratados con los AdLL37 (barra gris oscuro) y Ad β DEF (barra punteada) mostraron disminución de la carga bacilar en la cepa H37Rv (A) y en la cepa MDR (B). (Tomada y modificada de la referencia 27).

La citocina proinflamatoria TNF α es crítica para el mantenimiento del estado de latencia, como lo demuestra la reactivación de TB latente en pacientes con artritis reumatoide que reciben anticuerpos neutralizantes vs TNF α (28). Los niveles altos de los péptidos antimicrobianos PAMs beta defensina (β DEF) y catelicidina (LL37) también son de gran relevancia para mantener en estado de quiescencia a la micobacteria (11).

Por la importancia que tiene el TNF α y los PAMs para mantener a la TB latente, utilizamos el modelo correspondiente en nuestro laboratorio (29) y la aplicación de estos adenovirus evitó que aumentara la carga bacteriana en animales sometidos a inmunosupresión con glucocorticoides con respecto al control y en especial el AdTNF α indujo la

formación de granulomas grandes que correlacionan con protección (Figura 10).

Después de administrar Ad β DEF, AdLL37 se observa inducción de inflamación y disminución en la carga bacteriana y neumonía lo que correlaciona con protección en nuestro modelo. Como podemos observar en la Figura 10 encontramos que hubo una disminución en la carga bacteriana en los tratados con los adenovirus que expresan TNF α y los péptidos antimicrobianos Ad β DEF, AdLL37 (A), la neumonía también se observa disminuida (B) y el área de granulomas se encontró aumentada sobre todo en los ratones tratados con el AdTNF α lo cual correlaciona con el control de la infección en nuestro modelo (C). En (D) se observa una micrografía de pulmón tratada con Ad β DEF donde se presenta inflamación

perivascular y peribronquial (flechas) en (E) se observa un granuloma grande (flecha), corresponde a una micrografía de ratón tratado con AdTNF α , en (F) se presenta un pulmón de ratón tratado con AdLL37 donde hay una inflamación

alrededor de los vasos sanguíneos (flechas), por último (G) corresponde al grupo control (Ad70, adenovirus vacío) donde se presenta una extensa neumonía.

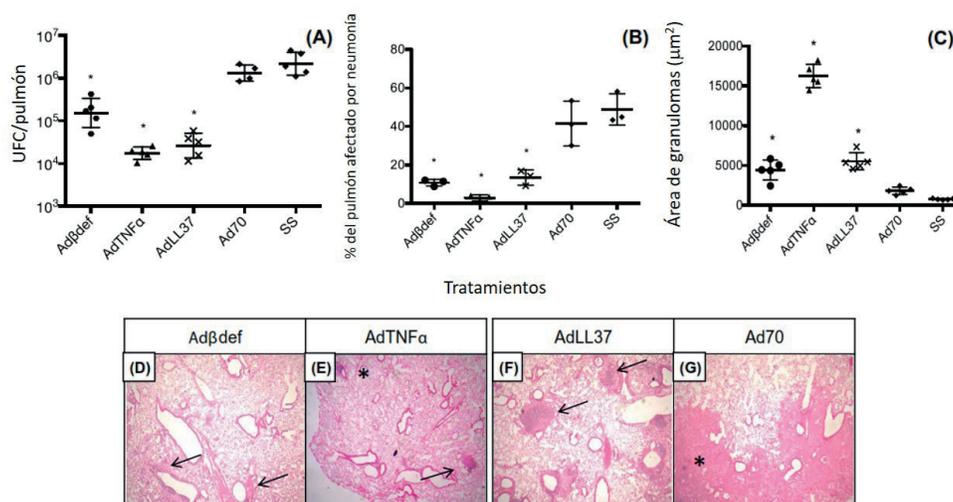


Figura 10. Efecto de la administración de Ad β DEF, AdTNF α y AdLL37 en un modelo parecido a TB latente con reactivación inducida por glucocorticoides. En comparación con los ratones control que recibieron sólo el vehículo (solución salina SS) o los adenovirus vacíos (Ad70), los animales tratados con los adenovirus recombinantes indicados mostraron disminución significativa de la carga bacilar (A) y de la neumonía (B), con incremento del tamaño de los granulomas (C), sobre todo los tratados con AdTNF α . Micrografías representativas de los pulmones de ratones tratados con los adenovirus indicados. El pulmón del ratón control (Ad70) muestra neumonía extensa (G) (asterisco), en comparación los animales tratados con los adenovirus recombinantes (D,E,F) muestran granulomas de gran tamaño (flechas, AdTNF α , AdLL37), inflamación perivascular (flecha Ad β def) y áreas mínimas de neumonía (Tomada y modificada de la referencia 29).

Conclusión

La estrategia inicial en el diseño de los adenovirus usados como inmunoterapia fue elegir factores inmunológicos (citocinas y PAM) que activaran macrófagos y linfocitos T polarizándolos hacia el perfil M1 y Th1 respectivamente, para controlar el crecimiento micobacteriano.

Nuestros resultados experimentales muestran que la terapia génica en la TB puede ser muy útil para acortar tiempos de tratamiento al asociarla con la quimioterapia tuberculosa convencional y la de segunda línea, las ventajas de su uso en la TB pulmonar es el tropismo de los adenovirus hacia el epitelio respiratorio y macrófagos alveolares, además de que en la mayoría de los experimentos se usó una sola dosis.

Nuestros resultados muestran que algunos adenovirus pueden utilizarse tanto en experimentos profilácticos como los desarrollados en el modelo de latencia y para evitar la transmisión de las bacterias, así como en experimentos terapéuticos cuando la enfermedad es activa y extensa.

Los adenovirus utilizados podrían ser también útiles en enfermedades causadas por otros patógenos intracelulares, ya sean virus, parásitos, hongos o bacterias.

Referencias

- Ramos-Espinosa, O., Islas-Weinstein, L., Peralta-Álvarez, M.P., López-Torres, M.O., Hernández-Pando, R. (2018) The use of immunotherapy for the treatment of tuberculosis. *Expert Rev Respir Med.* 12.427-440 DOI: 10.1080/17476348.2018.1457439.
- Loustalot, F., Kremer, E., Salinas, S. (2015). Membrane Dynamics and signaling of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Int. Rev Cell Mol Biol.* 322.331-362. DOI: 10.1016/bs.iremb.2015.10.006.
- Shermila, K., Suresh, K.T. (2022). Adenovirus Core Proteins and Function. *Viruses*, 13. 1-16. <https://doi.org/10.3390/v13030388>.
- Garbuglia, A.R., Minosse, C., Del Porto, P. (2022). mRNA and adenovirus-based vaccines against SARS-Cov-2 in HIV positive people. *Viruses*. 14.1-19. DOI: 10.3390/v14040748.
- Mata-Espinosa, D., Mendoza Rodríguez, V., Aguilar León, D., Rosales, R., López Casillas, F., Hernández-Pando, R. (2008). *Mol. Ther.* 16. 1065-1072. doi:10.1038/mt.2008.69.
- Zhidong, H., Shui-Hua, L., Douglas, BL., Xiao-Yong, Fan. (2022). *Front Immunol.* 13. 1-16. DOI: 10.3389/fimmu.2022.895020.
- Marquina-Castillo, B., García-García, L., Ponce de León, A., Jiménez-Corona, ME., Bobadilla del Valle, M., Cano-Arellano, B., Canizales Quintero, S. (2009). *Immunol.* 128. 123-133. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03004.x.
- Hernández-Pando, R., Orozco, H., Sampieri, A., Pavón, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., Alcocer, J.M., Madrid, M.V. (1996).

- Immunol.89.26-33. PMID: PMC1456655.
9. Hernández-Pando, R., Orozco, E.H., Arriaga, K., Sampieri, A., Larriva-Sahd, J., Madrid, V. (1997). Immunol.90.607-617. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1997.00193.x.
 10. Arriaga, A.K., Orozco, E.H. Aguilar, L.D., Rook, G.A., Hernández-Pando, R. (2002). Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary. Clin. Exp. Immunol. 128.229-237. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2002.01832.x.
 11. Rivas-Santiago, B., Contreras, JCL., Sada, E., Hernandez-Pando, R. (2008). The potential role of lung epithelial cells and b-defensins in experimental latent tuberculosis Scan. J. Immunol. 67. 448-52. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2008.02088.x.
 12. Estrada-García, I., Hernández-Pando, R., Ivanyi, J. (2021). Editorial: Advances in immunotherapeutic approaches to tuberculosis. Front. Immunol.12.1-3. DOI: 10.3389/fimmu.2021.684200.
 13. Francisco-Cruz, A., Santelises, MA., Ramos-Espinosa, O., Mata-Espinosa, D., Marquina-Castillo, B., Barrios-Payan, J., Hernández-Pando, R. (2013). Granulocyte-macrophage colony-stimulating another haematopoietic growth factor. Med Oncol.30.1-14. DOI 10.1007/s12032-013-0774-6.
 14. Francisco Cruz, A., Mata Espinosa, D., Xing, Z., Hernández Pando, R. (2013). Immunotherapeutic effects of recombinant adenoviruses encoding GM-CSF in experimental pulmonary tuberculosis Clin. Exp. Immunol. 171. 283-97. doi:10.1111/cei.12015.
 15. Szeiga, J., Daniel, DS., Yang, C.H., Server, CZ., Jagannath, C., Chroneos ZC. (2000). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor mediated innate responses in tuberculosis. Tuberculosis Tuberculosis.88.7-20. DOI: 10.1016/j.tube.2007.08.009.
 16. Kedzierska, K., Mak, J., Mijch, A., Cooke, I., Rainbird, M., Roberts, S., Paukovics, G., Jolleys, D., López, A., Crowe, S.M., 2000. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments phagocytosis of Mycobacterium avium complex by human immunodeficiency virus type 1- infected monocytes/macrophages in vitro and in vivo J.Infect Dis.181:390-4. DOI: 10.1086/315191.
 17. Garcia-Romo, G.S., Pedroza González, A., Aguilar León, D., Orozco Esteves, H., Lambrecht, B.N., Estrada García, I., Flores, Romo., Hernández Pando, R. (2004). Airways infection with virulent Mycobacterium tuberculosis delays the influx of dendritic cells and the expression of costimulatory molecules in mediastinal lymph nodes. Immunology. 112: 661-8 DOI: 10.1046/j.1365-2567.2004.01904.x.
 18. Francisco-Cruz, A., Mata-Espinosa, D., Ramos-Espinosa, O., Marquina-Castillo, B., Estrada-Parra, S., Xing, Z, Hernández-Pando, R. (2016). Efficacy of gene therapy based on adenovirus encoding granulocyte- macrophage colony-stimulating factor in drug-sensitive and drug resistant experimental pulmonary tuberculosis. Tuberculosis. 100. 5-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2016.05.015>.
 19. Informe mundial sobre la tuberculosis 2020: sinopsis [Global tuberculosis report 2020: executive summary]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 20. Pedral-Sampaio, D.B., Netto, E.M., Brites, C., Bandeira, A.C., Guerra, C., Barberin, M.G., Badaro, R. (2003). Use of R hu-GMCSF in pulmonary tuberculosis patients: results of a randomized clinical trial Braz J Infect Dis. 7: 245-52. DOI: 10.1590/s1413-86702003000400004.
 21. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative immunity. Nat Rev.Immunol.3.133-146. DOI: 10.1038/nri1001.
 22. Mata-Espinosa, D., Francisco-Cruz, A., Marquina-Castillo, B., Barrios-Payan, J., Ramos-Espinosa, O., Bini, E.I., Xing, Z., Hernández-Pando, R. (2019). Immunotherapeutic effects of recombinant adenovirus encoding interleukin 12 in experimental pulmonary tuberculosis. Scand J Immunol. 89. 1-10. DOI: 10.1111/sji.12743.
 23. Hernandez-Bazán, S., Mata-Espinosa, D., Lozano-Ordaz, V., Ramos-Espinosa, O., Barrios-Payán, J., López-Casillas, F., Hernández-Pando, R. (2022). Immune Regulatory Effect of osteopontin gene therapy in a murine model of multidrug resistant pulmonary tuberculosis. Hum. Gene.Ther. 33.1037-1051. DOI: 10.1089/hum.2022.030.
 24. Rivas Santiago, C., Hernández-Pando, R., Rivas Santiago, B. (2013). Immunotherapy for pulmonary TB: antimicrobial peptides and their inducers. 10.1117-1126. DOI: 10.2217/imt.13.111.
 25. Castañeda-Delgado, J., Hernández-Pando, R., Serrano, C. J., Aguilar-León, D., León-Contreras, J., Rivas-Santiago, C., Méndez, R., González-Curiel, I., Enciso-Moreno, A., & Rivas-Santiago, B. (2010). Kinetics and cellular sources of cathelicidin during the course of experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis Clinical and Experimental Immunology, 161.542-550. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04199.x.
 26. Rivas-Santiago, B., Sada, E., Tsutsumi, V., Aguilar-León, D., Contreras, J.L., Hernández-Pando, R. (2006). Beta-defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. J Infec Dis 194, 697-701. DOI: 10.1086/506454.
 27. Ramos-Espinosa, O., Mata-Espinosa, D., Francisco-Cruz, A., López-Torres, MO., Hernández-Bazán, S., Barrios-Payán, J., Marquina-Castillo, B., Carretero, M., del Río M., Hernández-Pando, R. (2021) Immunotherapeutic effect of adenovirus encoding antimicrobial peptides in experimental pulmonary tuberculosis. Journal of Leukocyte Biology. 110 951-963. DOI: 10.1002/JLB.4MA0920-627R.
 28. Keane J., Gershon S., Wise, R.P. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor a neutralizing agent. N.Engl.J.Med, 345.1098-104. DOI: 10.1056/NEJMoa011110.
 29. Ramos-Espinosa, O., Hernández-Bazán, S., Francisco-Cruz, A., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payán, J., Marquina-Castillo, B., López-Casillas, F., Carretero, M., Del Rio, M., Hernández-Pando, R. (2016). Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis. Pathogens Diseases, 74.1-8. doi: 10.1093/femspd/ftw075.



DRA. DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA
ORCID 0000 0003 1704 4627

Investigadora en Ciencias Médicas “D”, adscrita al laboratorio de Patología Experimental del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Química farmacobióloga egresada de la Facultad de Química de la UNAM. Realizó la maestría con especialidad en Inmunología en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Realizó el Doctorado en Ciencias Bioquímicas en la facultad de Química de la UNAM, desarrollando su trabajo experimental en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Realizó un Posdoctorado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Cuenta con más de 60 publicaciones internacionales en revistas indexadas.

Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores, Nivel 1.

Es profesora de asignatura de la carrera de Biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM y forma parte de la plantilla de profesores de la Estancia Estudiantil de la Facultad de Química de la UNAM.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 103-111

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

El papel del microbioma en el desarrollo de la tuberculosis pulmonar.

The role of the microbiome in susceptibility and development of pulmonary tuberculosis.

Silva-Herzog Márquez Eugenia

Unidad de Vinculación Científica, Facultad de Medicina, UNAM en el Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Correspondencia: Unidad de Vinculación Científica, Facultad de Medicina, UNAM en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, CDMX (México) C.P. 14610, Tel. +52(55)5350-1900 ext. 1220, esilvaherzog@inmegen.gob.mx

Resumen

El estudio del microbioma humano (las comunidades de microorganismos que cohabitan en el cuerpo), ha cambiado la concepción de lo que es la salud y enfermedad. Los distintos microbiomas del cuerpo humano son diversos y dinámicos. El microbioma respiratorio, interacciona con el sistema inmune y es parte de la protección en contra de patógenos, modulando la respuesta inmune, actuando como barrera y como competencia a estos microorganismos. La susceptibilidad y desarrollo de enfermedades infecciosas como la tuberculosis, se ven afectadas por la microbiota respiratoria residente. Particularmente hemos detectado cambios en la microbiota respiratoria en pacientes con tuberculosis activa y sus contactos con tuberculosis latente.

Palabras clave: microbioma; microbiota respiratoria; salud y enfermedad; tuberculosis; tuberculosis latente; alfa y beta-diversidad.

Abstract

The human body supports dynamic and diverse communities of microorganisms, collectively called the microbiome. The study of these communities and its interaction with the host have changed the conception of health and disease in recent years.

The microbiome interacts with the immune system, and is a key component of the protection against pathogens, by regulating the immune response, acting as a barrier or as nutrient and niche competition. The susceptibility and development of infectious diseases, like tuberculosis, are affected by the resident microbiome. Alteration of the microbiome of patients with active tuberculosis as well as latent infections have been reported and may be a potential therapeutic target.

Keywords: microbiome; respiratory microbiota; health and disease; tuberculosis; latent tuberculosis infection; alpha and beta diversity.

Introducción

El concepto de salud y enfermedad ha cambiado drásticamente a lo largo del tiempo. Desde el “miasma” o aires fétidos que se pensaba transmitían las enfermedades en la Edad Media,

la ‘Teoría de los Gérmenes’ de Koch y Pasteur en el siglo XIX, y la ‘Teoría Molecular de las Enfermedades’ de Staley Falkow en el 2000; recientemente prevalece una visión más integral que incorpora a las comunidades microbianas: patógenos y comensales o microbioma, que cohabitan en

el cuerpo. Inclusive la Organización Mundial de la Salud, incluye al microbioma en su visión de “Una Salud” donde la salud del individuo está en equilibrio y depende de la salud del medio ambiente, los animales y sus microorganismos (WHO, One Health).

El término de microbioma, fue sugerido inicialmente por Whipps y colaboradores en 1988, tiene una base predominantemente ecológica. Ellos definen al microbioma como una comunidad de microorganismos característica, en

un hábitat particular con propiedades fisicoquímicas definidas; esto es, el microbioma es un nicho ecológico específico donde microorganismos y hospedero interactúan. Por otro lado, la microbiota se refiere al conjunto de microorganismos: bacterias, arqueas, hongos, protozoarios, y virus que forman este microbioma; las propiedades fisicoquímicas (estructuras y metabolitos tanto microbianas como del hospedero) son el “escenario de actividad” del microbioma (Berg, 2020). Finalmente, el metagenoma es el conjunto de genes y genomas de la microbiota.

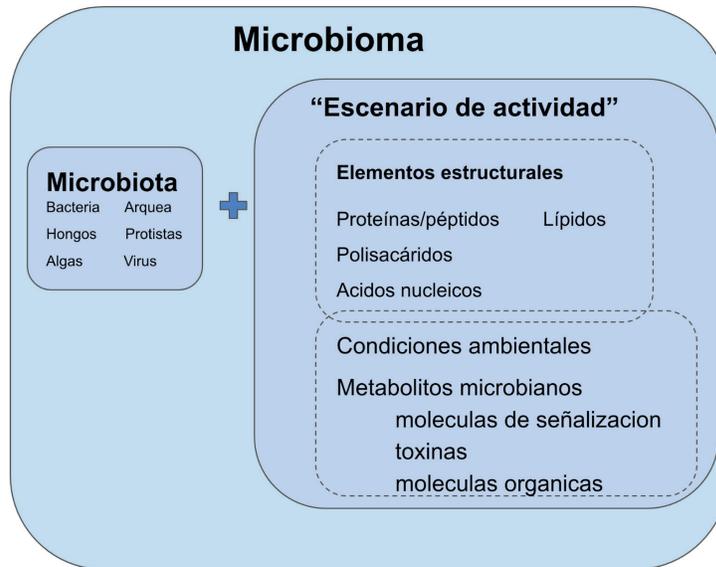


Figura 1. Esquema que resalta la composición del término microbioma y su diferencia con el término microbiota. Modificado de Berg et al 2020.

El microbioma es un sistema dinámico que ha evolucionado con la especie humana y sigue evolucionando durante la vida del individuo. Su composición depende de la vía de nacimiento (vaginal o cesárea), el tipo de alimentación durante y después de la lactancia (leche materna o fórmula, alto en fibra o en grasas), así como de otros factores como género, hábitos de higiene, uso de antibióticos, índice de masa corporal, nivel de actividad física. Además, del lugar geográfico donde se habita (nivel del mar o cima de las montañas, zona urbana o rural, etc). Por ejemplo, bebés nacidos por vía vaginal tienen un microbioma gastrointestinal más diverso que aquellos nacidos por cesárea, caracterizados por una mayor abundancia de *Actinobacterias*, *Gamma* y *Betaproteobacterias* (Reyman 2019). Por otro lado aquellos individuos que habitualmente consumen una dieta alta en fibra contienen una mayor abundancia de Firmicutes como *Prevotella* y menor abundancia de Bacteroidetes como *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Bilophila*, y *Alistipes* que poblaciones con una dieta baja en fibra (Cronin, 2021).

El microbioma de los distintos sitios anatómicos, varía de acuerdo a las condiciones fisicoquímicas particulares de cada nicho, como temperatura, concentración de oxígeno,

disponibilidad de nutrientes, pH, etc. Estas diferencias se pueden observar inclusive a nivel de phylum; por ejemplo la microbiota oral está caracterizada por una mayor abundancia de Firmicutes y Proteobacterias con un menor representación de Bacteroidetes, Actinobacteria y Fusobacterium; la microbiota nasal está compuesta principalmente por los phylum Actinobacteria y Firmicutes, mientras que la microbiota vaginal por Firmicutes y la microbiota gastrointestinal es principalmente anaerobia de los phylums Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria (Dieterich 2018). El estudio del microbioma se rige por conceptos ecológicos, ya que en la naturaleza los organismos se encuentran en comunidades y no aislados como individuos. Estos conceptos incluyen simbiosis y antagonismos; estabilidad y resiliencia; perturbaciones y extinción, todos los cuales impactan el balance entre salud y enfermedad. Las relaciones simbióticas son interacciones positivas, es decir, ambas especies involucradas obtienen ganancias (mutualismo), como pueden ser nutrientes, hábitat; o el beneficio de una no afecta a las otras especies (comensalismo). La resiliencia es la capacidad de la comunidad de regresar a un estado funcional después de una perturbación y se conoce como eubiosis; y las extinciones suceden después de perturbaciones que resultan en una

disbiosis que no se recupera (Barbosa-Amezcuca 2022).

Funciones del microbioma

Los estudios de microbioma se multiplicaron al hacerse más accesibles las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación, ya que esto permitió identificar organismos aun sin cultivarlos en el laboratorio. Inicialmente se utilizó la secuenciación dirigida de las regiones variables del gen 16S rRNA que identifica los distintos géneros bacterianos, y posteriormente con un enfoque más integral utilizando la secuenciación de metagenoma por “shut-gun” donde se pueden identificar todos los microorganismos presentes incluidos virus, hongos, bacterias, arqueas y eucariontes, así como genes funcionales.

Estos estudios han evidenciado el papel fundamental del microbioma en el funcionamiento del cuerpo humano. Dentro de las funciones principales se encuentran la digestión de carbohidratos complejos, la producción de vitaminas (K, B12, Biotina, ácido fólico y pantoténico), síntesis de aminoácidos a partir de amoníaco o urea, detoxificación de xenobióticos, regulación de metabolismo; por otro lado es parte integral de la prevención de colonización de microorganismos patógenos, como barrera a microorganismos oportunistas, así como por la eliminación de nichos accesibles a patógenos o secreción de inhibidores; y de la “educación” o entrenamiento del sistema inmune innato y adaptativo local y sistémico (Moreno del Castillo et al., 2018).

El tracto gastrointestinal ha sido uno de los primeros focos de atención, en parte por la facilidad de obtención de muestras y el gran número de microorganismos presentes; hay numerosos estudios que demuestran la influencia de la microbiota gastrointestinal (MGI) en sistema metabólico, endocrinos e inmunitario, inclusive en sistema nervioso periférico y central, así como en la participación, a partir de los primeros 1000 días de vida, en el estado de salud del individuo (Zheng, 2020, Al Nabhani Z, 2020). El estado de este MGI contribuye a mediano y largo plazo en la producción de enfermedades crónicas no transmisibles, como la obesidad, esteatosis hepática no alcohólica, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y neuro-psiquiátricas, como el espectro autista (Askarova, 2020, Iatcu, 2021).

Microbiota del tracto respiratorio

Hasta hace poco tiempo, se consideraba al tracto respiratorio, especialmente los pulmones, como un nicho estéril o “libre de bacterias” y microorganismos. Es por esto que no se incluyó en el estudio fundacional del Proyecto del Microbioma Humano de 2007 (Turnbaugh, P., 2007). Sin embargo, no es de sorprender que los pulmones tengan una microbiota residente, ya que están en constante contacto con el medio exterior; se intercambian cerca de 7000 litros de aire al día y tienen una superficie de hasta 70m² en adultos (30 veces más que la piel) (Man et al., 2017). A diferencia del tracto gastrointestinal, que tiene una temperatura constante y una alta concentración de bacterias, las vías respiratorias se

caracterizan por tener un gradiente de temperatura, una alta concentración de oxígeno y una baja densidad bacteriana. La composición y densidad del microbioma respiratorio cambia en condiciones patológicas como enfermedades infecciosas, asma, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), Fibrosis Quística (FQ) e inclusive en cáncer de pulmón (Santacroce et al 2020). Muchas de estas enfermedades tienen en común el establecimiento de un proceso inflamatorio y un enriquecimiento de Gammaproteobacterias. Las Gammaproteobacterias incluyen taxones que utilizan subproductos de la respuesta inmune como las catecolaminas y las citocinas inflamatorias como nutrientes, lo que les confiere una ventaja adaptativa sobre aquellos miembros de la microbiota pulmonar que son eliminados por estos mismos componentes.

Función del microbioma respiratorio

Al igual que la microbiota en el tracto gastrointestinal, el microbioma respiratorio es fundamental para el funcionamiento y desarrollo de los pulmones. La microbiota libera factores que ayudan a la función respiratoria incluyendo la secreción del surfactante alveolar por las células epiteliales e inclusive se le ha asociado al desarrollo del tejido linfoide nasofaríngeo.

La microbiota de la superficie respiratoria modula las comunidades microbianas presentes y entrena al sistema inmune para reconocer y tolerar a los microorganismos. Puede actuar como una barrera, previniendo la adhesión de virus o bacterias a las células del hospedero. Especies del género *Veillonella*, por ejemplo, forman biopelículas que favorecen el crecimiento de *Streptococcus spp.*, pero inhiben el crecimiento de otras especies (Cook et al 2013). Por otro lado, también hay competencia de nicho; uno de los ejemplos más estudiados es el de *Streptococcus pneumoniae* que inhibe el establecimiento y crecimiento de *Staphylococcus aureus* mediante la producción de H₂O₂.

La exposición de las células inmunes en el pulmón prepara o entrena al sistema inmune innato y adaptativo. Hay evidencias que muestran que la función de las células efectoras y reguladoras T-gamma delta depende de su previo encuentro con microorganismos (Segal, 2016). Estudios con niños y bebés expuestos a medios microbiológicos ricos como granjas y otros medios rurales, muestran que estos tienen una menor incidencia de asma, alergias y una inmunidad más robusta que individuos que crecieron en un medio urbano hiper-higiénico. Por otra parte, se sabe que los metabolitos y receptores microbianos membranales estimulan el reclutamiento y activación de células como los macrófagos alveolares y células T reguladoras durante la infección, además de estimular la liberación de péptidos antimicrobianos (AMP) e inmunoglobulinas (Man, 2017).

Es importante enfatizar que, la respuesta inmune responde a cambios en la microbiota y a su vez la modifica promoviendo el crecimiento selectivo de algunas especies; por lo cual se

dice que la relación entre la respuesta inmune y el microbioma pulmonar es bidireccional y se ha propuesto la hipótesis de que muchas enfermedades no son provocadas por un solo microorganismo, sino por la alteración del ecosistema respiratorio y la interacción de varios microorganismos actuando sinérgicamente.

La composición de la microbiota pulmonar depende de la inmigración, la eliminación y la tasa de crecimiento de los distintos microorganismos en el área (Dickson, 2016 & O'Dwyer, 2016). Durante la salud, esta composición está determinada por el equilibrio entre la inmigración y eliminación microbiana, mientras que en la enfermedad la tasa relativa de crecimiento de los diferentes componentes del microbioma, aunado al desequilibrio de esta inmigración-eliminación, son los factores determinantes (Dickson, 2016). Por ejemplo, en enfermedades crónicas como la FQ, la bronquiectasia y bronquitis crónica, que se caracterizan por un deterioro del movimiento mucociliar e inflamación hay una disminución de la eliminación de microorganismos y un cambio fundamental en el ambiente pulmonar. Este cambio incluye la presencia de citocinas y células inflamatorias, daño tisular, producción de moco, aumento de nutrientes, bolsas de anoxia, y un aumento en la temperatura local. Esto, aunado a las distintas tasas de crecimiento, resulta en el incremento selectivo de algunas especies como *Pseudomonas aeruginosa* y especies anaerobias como *Prevotella* spp. y *Veillonella* spp. (Dickson, 2016).

Enfermedades del tracto respiratorio

Las enfermedades del sistema respiratorio representan una de

las primeras causas de atención médica tanto en la consulta, como en la hospitalización. A nivel mundial las enfermedades respiratorias tanto infecciosas como no-infecciosas, son la cuarta causa de muerte y de disminución en 'Años de Vida Ajustados por la Discapacidad' (AVAD) (Labaki, W. & Han, M., 2020; PAHO/OMS, 2021). Hoy en día, la pandemia de COVID-19 es la causa de mayor mortalidad en México y el mundo. En México, la influenza, neumonía, tuberculosis y la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) están todas dentro de las primeras nueve causas de mortalidad en los últimos años.

Dentro de las enfermedades infecciosas de las vías respiratorias más comunes y de mayor impacto en la salud pública destacan la tuberculosis, la influenza, las neumonías y en este momento la enfermedad de COVID-19. En todas estas enfermedades, hay una alteración de la microbiota por el agente etiológico, y en todas hay evidencias de un papel de la microbiota en la evolución clínica de la enfermedad (De R, 2022; Shetty SA, 2022; Moroishi Y, 2022).

Tuberculosis

La tuberculosis (TB), hasta antes de la pandemia por SARS CoV-2, era la principal causa de muerte en el mundo por un agente infeccioso: *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), aun por encima del VIH (Global Tuberculosis Report 2022, WHO). La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que solo en 2018, alrededor de 10 millones de personas contrajeron dicha enfermedad y 1.5 millones murieron (Global Tuberculosis Report 2022, WHO).

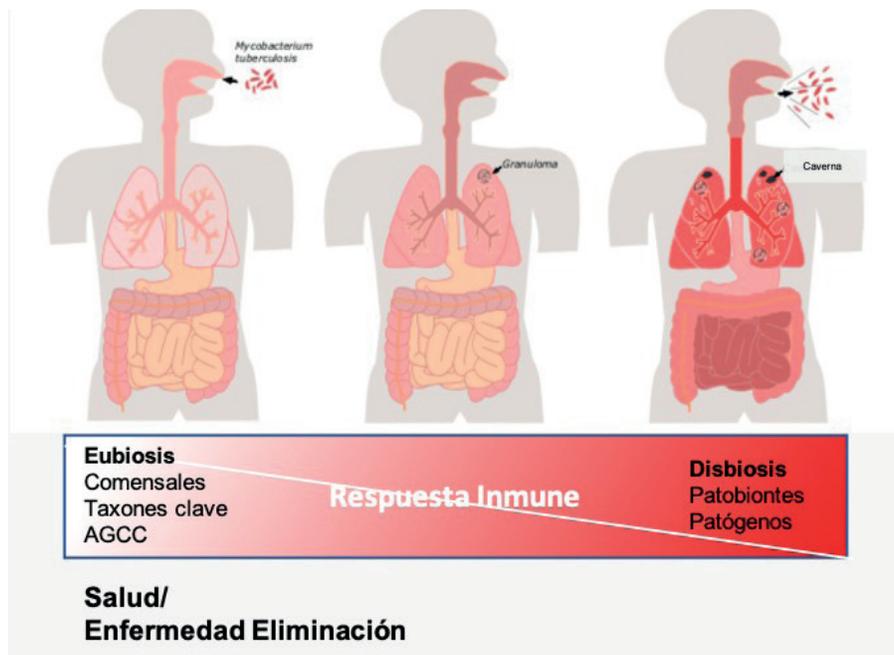


Figura 2. Esquema que representa los tres principales estadios de la tuberculosis. Barbosa - Amezcua, 2022.

La infección por Mtb se presenta como un espectro clínico que va desde la infección asintomática y no contagiosa o infección latente, hasta la enfermedad manifiesta y altamente transmisible o infección activa. En la TB latente, el cuerpo ha contenido el crecimiento de la micobacteria, pero no la ha eliminado, por lo cual la bacteria persiste en el organismo y puede revertir a TB activa durante la vida del paciente. Estudios sistemáticos de la prevalencia de ambas manifestaciones estima que un cuarto de la población mundial tiene TB latente y está en peligro de desarrollar la enfermedad activa, mientras que entre 5 y 10% de los individuos expuestos a Mtb desarrollan la TB activa (Cohen, 2019). El sistema inmune y el microbioma de cada persona determinan qué forma de la enfermedad se manifiesta.

Recientemente, se han realizado diversos estudios enfocados al análisis de la microbiota pulmonar y su relación con el establecimiento y desarrollo de la tuberculosis (Eshetie & Soolingen, 2019; Valdez-Palomares, 2021, Hu, 2020; Roquilly, 2019). Sin embargo no se ha podido establecer un consenso específico que refleje un cambio consistente en la microbiota pulmonar de pacientes con tuberculosis, probablemente por diferencias en el tipo de muestras y diferencias propias de las poblaciones muestreadas; lo cual apoya la hipótesis de que el desarrollo de la tuberculosis puede estar determinado no solo por el agente causal de la enfermedad, sino también por la interacción de éste con las

comunidades microbianas locales y factores inmunológicos. En colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), en el laboratorio de Vinculación Científica, UNAM-INMEGEN, hemos abordado el análisis de la microbiota respiratoria en pacientes con tuberculosis pulmonar activa en México. En un primer estudio nos enfocamos en analizar la microbiota respiratoria de pacientes con TB pulmonar activa en comparación con la de voluntarios sanos. Todos los participantes son evaluados y en su caso, tratados clínicamente en el INER, son VIH negativos y tienen una confirmación de diagnóstico por cultivo y por pruebas moleculares.

La diversidad y composición bacteriana de estas muestras respiratorias, se analizaron utilizando la secuenciación de nueva generación (NGS) de la región hipervariable V3-V4 del gen 16S ribosomal y el programa bioinformático Qiime2.

La alfa-diversidad (la variación en cada muestra) de la microbiota de voluntarios sanos es mayor que aquella de pacientes con TB activa, como lo muestra el índice Simpson ($p=0.022$) (Figura 3A); la beta diversidad (Figura 3B) que evalúa la variación de comunidades microbianas en los dos grupos, muestra que los individuos sanos tienen una comunidad bacteriana filogenéticamente relacionada, mientras que los pacientes con tuberculosis tienen especies más diversas.

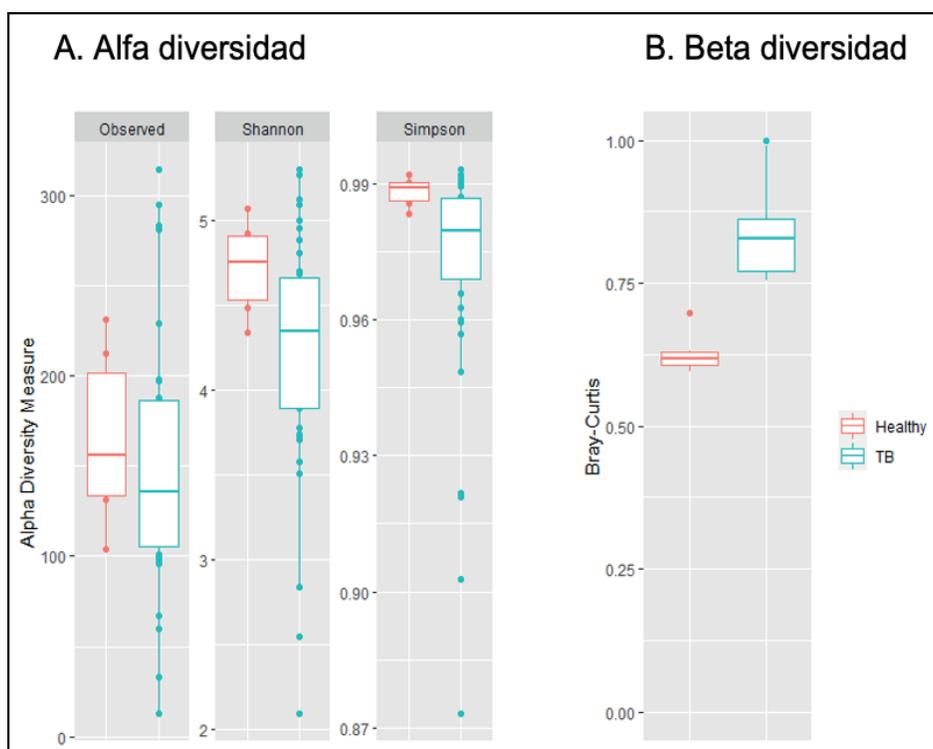
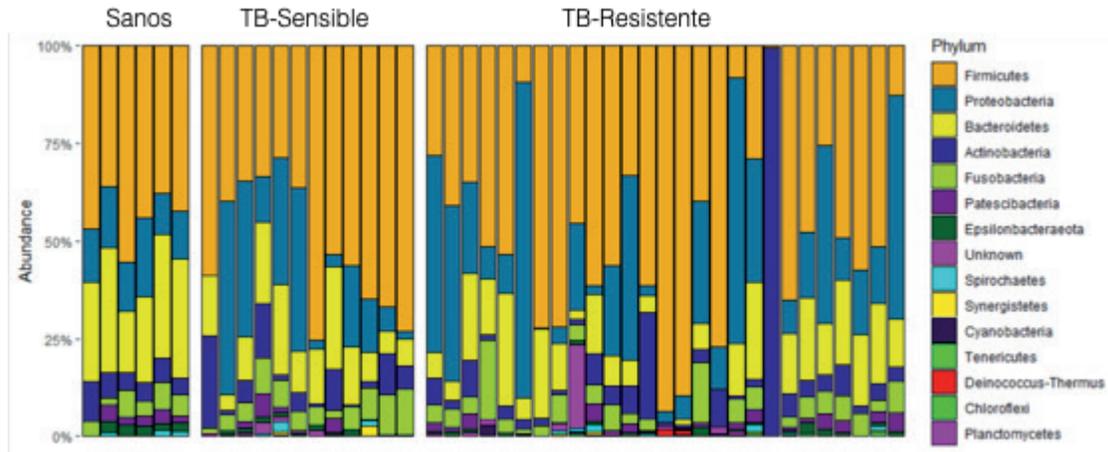


Figura 3. Alfa y Beta diversidad de la microbiota respiratoria de pacientes con tuberculosis activa (TB, verde) y voluntarios sanos (Healthy, color rojo)

En cuanto a la composición taxonómica, encontramos 202 géneros independientes; 142 géneros con abundancia relativa mayor a 0.01% en pacientes con TB activa, y 72 en el grupo control. Observamos un incremento de los phylums Bacteroidetes, Epsilon Bacteroarchota, Patascibacteria y Spirochaetes en individuos sanos. Los géneros más

abundantes en los voluntarios sanos son *Streptococcus*, *Prevotella* 7, *Veillonella*, *Prevotella* y *Alloprevotella*, mientras que en los pacientes con TB activa, los más prevalentes son *Streptococcus*, *Neisseria*, *Prevotella* 7, *Moraxella* y *Veillonella*. (Figura 4)

A



B

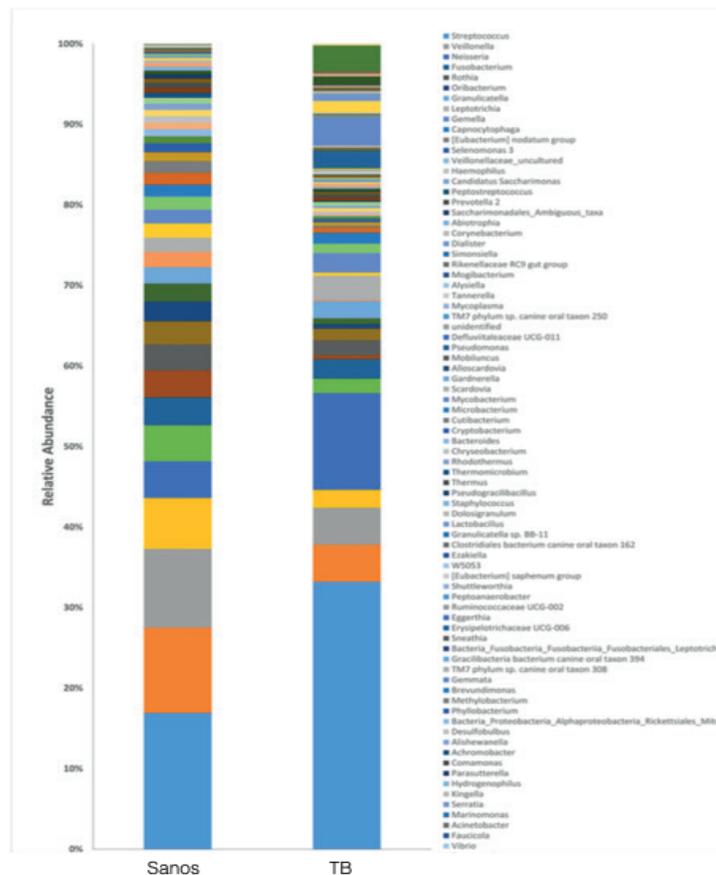


Figura 4. Phylums (A) y géneros (B) predominantes en la microbiota respiratoria de pacientes con TB activa y voluntarios sanos. Tomado de Valdez-Palomares 2021.

Utilizamos la herramienta ANCOM-BC para identificar las diferencias en la abundancia de géneros en pacientes con TB activa y voluntarios sanos (Figura 5). Los voluntarios sanos tienen un aumento de géneros anaerobios como: *Aggregatibacter*, *Solobacterium*, *Corynebacterium*, *Megasphaera*, *Atopobium*, *Rothia*, *Porphyromonas* y *Treponema*, componentes de la microbiota oral comensal.

En cambio la microbiota de pacientes con TB activa tienen una menor proporción de anaerobios (0.15% vs 0.399%). Los géneros *Moraxella* y *Ralstonia*, se encontraron exclusivamente en los pacientes de TB. Ambos géneros son aerobios obligados y miembros comensales de la microbiota oral y otras mucosas, pero patógeno oportunista del tracto respiratorio inferior.

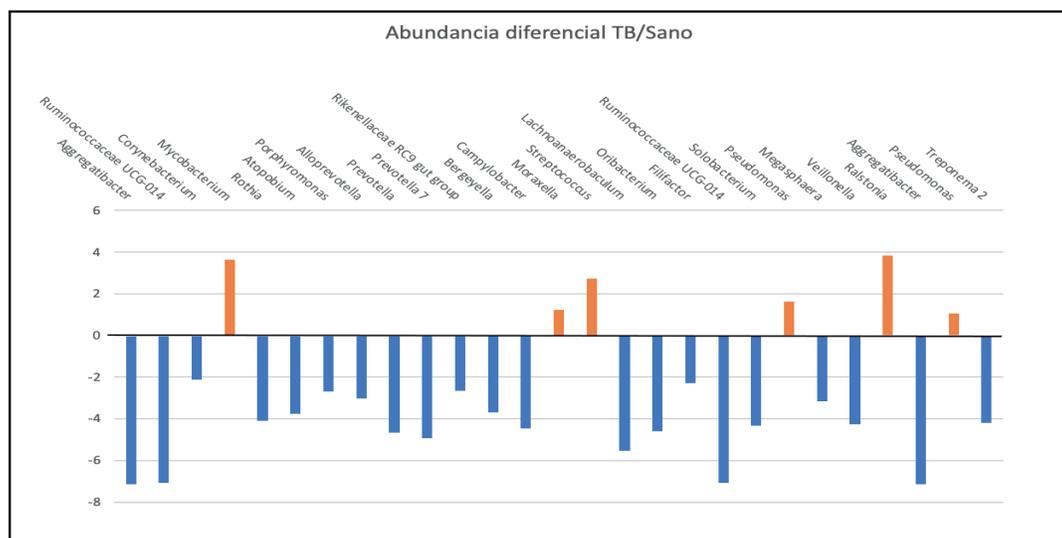


Figura 5. Abundancia diferencial de géneros prevalentes en TB vs sanos. Los géneros más abundantes en sanos están en color azul y en naranja los más abundantes en TB.

Más aún, observamos mayor diversidad y heterogeneidad en la microbiota pulmonar de enfermos con TB farmacorresistente comparado con TB sensible, incluyendo un incremento en la proporción de *Pseudomonas* y miembros de la familia *Sphingomonadaceae* los cuales son naturalmente resistentes a aminoglucósidos, fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la tuberculosis. Esto puede deberse a una selección de estas bacterias por el uso del antibiótico anti-tuberculoso.

Todos estos resultados nos confirman un cambio en composición y diversidad de la microbiota respiratoria durante la infección con tuberculosis, que hipotetizamos, afecta el desarrollo y desenlace de la enfermedad. En el futuro esperamos poder modificar la microbiota para poder modular el desarrollo de la enfermedad y la susceptibilidad de población en riesgo.

Referencias

- Al Nabhani, Z., & Eberl, G. (2020). Imprinting of the immune system by the microbiota early in life. *Mucosal Immunology*, **13**(2), 183–189. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-0257-y>
- Askarova, S., Umbayev, B., Masoud, A.-R., Kaiyrylykzy, A., Safarova, Y., Tsoy, A., Olzhayev, F., & Kushugulova, A. (2020). The links between the gut microbiome, aging, modern lifestyle and alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00104>
- Barbosa-Amezcu, M., Galeana-Cadena, D., Alvarado-Peña, N., & Silva-Herzog, E. (2022). The microbiome as part of the contemporary view of tuberculosis disease. *Pathogens*, **11**(5), 584. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050584>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, **8**(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Cohen, A., Mathiasen, V. D., Schön, T., & Wejse, C. (2019). The global prevalence of latent tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*, **54**(3), 1900655. <https://doi.org/10.1183/13993003.00655-2019>
- Cook, L. C., LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Interspecies communication among commensal and pathogenic streptococci. *MBio*, **4**(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.00382-13>
- Cronin, P., Joyce, S. A., O'Toole, P. W., & O'Connor, E. M. (2021). Dietary fibre modulates the gut microbiota. *Nutrients*, **13**(5), 1655. <https://doi.org/10.3390/nu13051655>
- Cronin, P., Joyce, S. A., O'Toole, P. W., & O'Connor, E. M. (2021). Dietary fibre modulates the gut microbiota. *Nutrients*, **13**(5), 1655. <https://doi.org/10.3390/nu13051655>
- De, R., & Dutta, S. (2022). Role of the microbiome in the pathogenesis of covid-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **12**.

- <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.736397>
10. Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Martinez, F. J., & Huffnagle, G. B. (2016). The microbiome and the respiratory tract. *Annual Review of Physiology*, **78**(1), 481–504. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105238>
 11. Dieterich, W., Schink, M., & Zopf, Y. (2018). *Microbiota in the gastrointestinal tract. Medical Sciences*, **6**(4), 116. <https://doi.org/10.3390/medsci6040116>
 12. Eshetie, S., & van Soolingen, D. (2019). The respiratory microbiota: New insights into pulmonary tuberculosis. *BMC Infectious Diseases*, **19**(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3712-1>
 13. Global tuberculosis report 2022. Geneva: *World Health organization; 2022*. licence: cc BY-NC-sa 3.0 iGo
 14. Hu, Y., Kang, Y., Liu, X., Cheng, M., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., Ren, X., Yang, Q., Chen, X., Jin, Q., & Yang, F. (2020). Distinct lung microbial community states in patients with pulmonary tuberculosis. *Science China Life Sciences*, **63**(10), 1522–1533. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-1614-0>
 15. Iatcu, C. O., Steen, A., & Covasa, M. (2021). Gut microbiota and complications of type-2 diabetes. *Nutrients*, **14**(1), 166. <https://doi.org/10.3390/nu14010166>
 16. Labaki, W. W., & Han, M. L. K. (2020). Chronic respiratory diseases: A global view. *The Lancet Respiratory Medicine*, **8**(6), 531–533. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30157-0](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30157-0)
 17. Man, W. H., de Steenhuijsen Piters, W. A. A., & Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. *Nature Reviews Microbiology*, **15**(5), 259–270. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.14>
 18. Moreno del Castillo, M. C., Halabe Cherem, J., & Valladares-García, J. (2018). Human microbiome. *Revista de la Facultad de Medicina*, **61**(6), 7–19. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2018.61.6.02>
 19. Moroishi, Y., Gui, J., Hoen, A. G., Morrison, H. G., Baker, E. R., Nadeau, K. C., Li, H., Li, Z., Madan, J. C., & Karagas, M. R. (2022). The relationship between the gut microbiome and the risk of respiratory infections among newborns. *Communications Medicine*, **2**(1). <https://doi.org/10.1038/s43856-022-00152-1>
 20. O'Dwyer, D. N., Dickson, R. P., & Moore, B. B. (2016). The Lung Microbiome, immunity, and the pathogenesis of chronic lung disease. *The Journal of Immunology*, **196**(12), 4839–4847. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600279>
 21. PAHO. The burden of chronic respiratory diseases in the Region of the Americas, 2000-2019. *Pan American Health Organization, 2021*
 22. Reyman, M., van Houten, M. A., van Baarle, D., Bosch, A. A., Man, W. H., Chu, M. L., Arp, K., Watson, R. L., Sanders, E. A., Fuentes, S., & Bogaert, D. (2019). Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nature Communications*, **10**(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13014-7>
 23. Roquilly, A., Torres, A., Villadangos, J. A., Netea, M. G., Dickson, R., Becher, B., & Asehnoune, K. (2019). Pathophysiological role of respiratory dysbiosis in hospital-acquired pneumonia. *The Lancet Respiratory Medicine*, **7**(8), 710–720. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(19\)30140-7](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(19)30140-7)
 24. Santacroce, L., Charitos, I. A., Ballini, A., Inchingolo, F., Luperto, P., De Nitto, E., & Topi, S. (2020). The human respiratory system and its microbiome at a glimpse. *Biology*, **9**(10), 318. <https://doi.org/10.3390/biology9100318>
 25. Segal, L. N., Clemente, J. C., Tsay, J.-C. J., Koralov, S. B., Keller, B. C., Wu, B. G., Li, Y., Shen, N., Ghedin, E., Morris, A., Diaz, P., Huang, L., Wikoff, W. R., Ubeda, C., Artacho, A., Rom, W. N., Serman, D. H., Collman, R. G., Blaser, M. J., & Weiden, M. D. (2016). Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a th17 phenotype. *Nature Microbiology*, **1**(5). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.31>
 26. Shetty, S. A., van Beek, J., Bijvank, E., Groot, J., Kuiling, S., Bosch, T., van Baarle, D., & Fuentes, S. (2022). Associations and recovery dynamics of the nasopharyngeal microbiota during influenza-like illness in the aging population. *Scientific Reports*, **12**(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05618-9>
 27. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). *The Human Microbiome Project. Nature*, **449**(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
 28. Valdez-Palomares, F., Muñoz Torrico, M., Palacios-González, B., Soberón, X., & Silva-Herzog, E. (2021). Altered microbial composition of drug-sensitive and drug-resistant TB patients compared with healthy volunteers. *Microorganisms*, **9**(8), 1762. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081762>
 29. World Health Organization. (n.d.). One Health. *World Health Organization*. Retrieved from https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab_1
 30. Whipps, J. M., & McQuilken, M. P. (n.d.). *Biological control agents in Plant Disease Control*. Disease Control in Crops, 27–61. <https://doi.org/10.1002/9781444312157.ch3>
 31. Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*, **30**(6), 492–506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>



EUGENIA SILVA-HERZOG MÁRQUEZ
ORCID 0000-0001-5620-8722

Licenciada en Investigaciones Biomédicas Básicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Recibió la Medalla Gabino Barreda por estudios de Licenciatura. Realizó estudios de posgrado (MPh) en la Universidad de Columbia, Estados Unidos y el doctorado en Investigaciones Biomédicas Básicas en la UNAM.

Su carrera de investigación se ha centrado en aspectos microbiológicos y bioquímicos de bacterias patógenas del ser humano y su interacción con las células blanco. Los aspectos

estudiados incluyen: el Sistema de Secreción Tipo 3 de *Salmonella typhimurium* y *Yersinia pestis*; su interacción con las células blanco tanto en modelos de infección aguda como persistente; *in vitro*, *ex vivo* así como modelos animales.

Ha realizado estancia posdoctorales en la Universidad de Miami y fue Investigadora Asociada en la Universidad de Colorado Boulder, Estados Unidos de Norteamérica.

Actualmente, en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, ha centrado su interés en el papel del microbioma y la respuesta inmune, principalmente en el contexto de enfermedades infecciosas como la tuberculosis. Es parte del Sistema Nacional de Investigadores, nivel candidato.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 112-121

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

La visualización de la transcriptómica espacial en tejidos: fundamentos y nuevos descubrimientos.

The visualization of the spatial transcriptomics on tissues: principles and new discoveries.

Farrera-Hernández, Alejandro¹; Vázquez-Jiménez, Aarón² y Mandujano-Tinoco, Edna Ayerim^{1*}.

¹Laboratorio de Tejido Conjuntivo, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados, Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”.

²Laboratorio de Biología de Sistemas en Enfermedades Humanas. Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

*Correspondencia. Laboratorio de Tejido Conjuntivo, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados, Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”. Avenida México Xochimilco Núm. 289, Colonia Arenal de Guadalupe, Alcaldía Tlalpan, CDMX (México), C.P. 14389, Tel: +52 (55) 59 99 10 00 Ext. 14706, eamanti24@gmail.com

Resumen

El avance de las técnicas para estudiar cambios de expresión génica como la hibridación *in situ* y los microarreglos, seguidos de la secuenciación de genomas y transcriptomas completos han transformado nuestra manera de entender la complejidad de distintos procesos fisiológicos y patológicos. Sin embargo, hasta hace algunos años era difícil estudiar la heterogeneidad celular de un tejido y mucho menos conocer cómo una subpoblación se diferencia hacia un tipo celular u otro. En este sentido, la técnica de secuenciación de RNA de célula única nos ha permitido conocer la diversidad transcriptómica de poblaciones celulares que se creían homogéneas en un tejido. Este conocimiento ha permitido avanzar en el estudio del cáncer, la fisiología del cerebro, el desarrollo embrionario, el cierre de heridas y la regeneración, entre otros. A pesar de ello, los datos de la secuenciación de RNA de célula única no nos permiten conocer la localización de cada subpoblación celular en el tejido, para ello es necesario buscar marcadores específicos de una población y ubicarlos mediante inmunohistoquímica o hibridación *in situ* de RNA. Ahora la técnica de transcriptómica espacial (e.g Visium de 10x Genomics) nos está permitiendo estudiar los perfiles de expresión génica y la localización de las subpoblaciones

Abstract

The emergence of new technologies to study gene expression such as *in situ* hybridization and microarrays followed by genome and transcriptome sequencing has transformed our understanding about the complexity of different physiopathological processes. However, some years ago it was difficult to study the cell heterogeneity from which tissues are composed and even less the paths from which one cell type differentiates into another. In this sense, the single cell RNA sequencing technique has allowed us to know the transcriptomic diversity of cell populations that we previously thought to be homogeneous within a tissue. This knowledge has been used to advance in the study of cancer, brain physiology, embryo development, wound healing, regeneration, among others. Nonetheless, with the single cell RNA sequencing data we are not able to find the localization of each cell subpopulation in the tissue, instead we must search for specific population biomarkers and to identify them by using immunohistochemistry or RNA *in situ* hybridization. Nowadays, the spatial transcriptomics technique (i.e 10X Genomics Visium) is making possible to study the gene expression profiles and to spatially localize each cell subpopulation within a tissue at the same time.

celulares que conforman a un tejido al mismo tiempo. En este artículo, explicaremos los fundamentos básicos de la técnica de Visium ya que es una de las tecnologías más recientes, para después dar ejemplos de los avances científicos que se han realizado con ella en diferentes campos de estudio como el cáncer y la cicatrización.

Palabras clave: transcriptoma, secuenciación, scRNAseq, transcriptómica espacial.

In the present work, we will explain the basic principles of the Visium technique since it is one of the most recent technologies, and then give some examples of scientific advancements that have been done in different fields of study such as cancer and wound healing.

Keywords: transcriptome, sequencing, scRNAseq, spatial transcriptomics.

Del descubrimiento de la célula a la transcriptómica espacial: develando la complejidad de los procesos biológicos

La aportación que dio la teoría celular a la biología cambió profundamente el estudio de los seres vivos y de su funcionamiento. Los tejidos de plantas, animales y hongos se pudieron incluir en parafina y cortar finamente para observarlos en laminillas con ayuda del microscopio. Desde el siglo XIX con el uso de colorantes que reaccionan con sustancias ácidas y básicas dentro de los tejidos, se identificó la morfología de las células que los conforman a un grado que jamás se había podido explorar. Los científicos de aquella época describieron de forma detallada la morfología y algunos cambios bioquímicos en los procesos fisiológicos de las células y los tejidos, lo que sirvió para clasificar morfológicamente todos (o la mayoría) los tipos de células de los animales. Cuando se observaron los cromosomas (nombrados así porque al usar colorantes reactivos al ácido se observaban como “cuerpos pintados”) y se descubrió que éstos contienen la información para producir las proteínas que mantienen vivo al organismo, se fue entendiendo que en los cromosomas es donde se regula la herencia descrita por Gregory Mendel.

A principios del siglo XX, con ayuda de innovaciones tecnológicas en química, las proteínas de los tejidos y órganos que nos componen se empezaron a secuenciar y clasificar. Así, al generar mutaciones puntuales en modelos de estudio como la *Drosophila melanogaster* se empezaron a descubrir enfermedades genéticas asociadas con la pérdida de proteínas específicas, o como en el caso del albinismo donde modificaciones en la secuencia de la melanina provoca la pérdida de pigmento en la piel (1). A mediados del siglo XX se descubrieron el DNA y el RNA, y a partir del conocimiento de sus estructuras y composición bioquímica se estableció el dogma central de la biología molecular, que implicaba que el flujo de la información genética inicia en una secuencia de DNA que se transcribe a RNA mensajero (mRNA) y posteriormente se traduce a una proteína (2). Ya en los 1970s-80s, técnicas como la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* ayudaron a visualizar cómo es la expresión de algunos genes directamente en los tejidos y órganos (3). Así se descubrió que existen genes que se expresan de manera

exclusiva durante el desarrollo embrionario y que además son tejido/órgano dependientes (4). Con dichas técnicas es posible ubicar espacialmente los transcritos de RNA mensajero o proteínas específicas en cortes histológicos, con la desventaja de que sólo se pueden analizar unos pocos transcritos o proteínas a la vez. Ante la necesidad de conocer cómo es la expresión de un conjunto de genes durante el desarrollo de un proceso biológico, se generaron los microarreglos, que permiten analizar cientos de genes (ya conocidos) al mismo tiempo.

Para la transición de siglo se logró la secuenciación de genomas completos (el total de genes de un organismo) (5) y poco tiempo después la secuenciación de transcriptomas (el total de mRNA de un organismo) (6). Aunque al inicio dichas tecnologías eran excesivamente costosas y el análisis de los datos representó un enorme reto para los científicos, la información obtenida de manera masiva dejó en claro que la dinámica de expresión de los genes en diversos órganos y tejidos es más compleja de lo que hubiéramos podido imaginar. Por otro lado, se descubrieron las células troncales y se inició el estudio de los procesos de diferenciación celular que contribuyen a la formación y reposición de tejidos en todo el organismo (7). Con toda esta información, se empezaron a dar pasos agigantados en el estudio de distintos procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la regeneración y la cicatrización, pero también de procesos patológicos como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, los datos de secuenciación de genoma o transcriptoma completo representan la expresión génica promedio de todas las células que componen al órgano/tejido en estudio (8), lo que limita nuestro conocimiento sobre los genes que se expresan de manera exclusiva en ciertos linajes celulares, los perfiles transcripcionales de diferentes poblaciones de células, los cambios transcriptómicos que guían la diferenciación de linajes celulares, las interacciones moleculares entre distintas poblaciones celulares, entre muchos otros aspectos.

La secuenciación de RNA de célula única (scRNAseq) fue usada por primera vez en 2011 para estudiar diferencias en la expresión de genes de células en proceso de segmentación post-cigótica (9). Esto se logró colocando a cada célula junto con una microesfera en un pozo de cultivo en donde ambas

podían interactuar en el medio. Las microesferas se fabricaron con una impresión microscópica de oligonucleótidos que reconocen a los mRNAs y que tienen una secuencia única para identificar a la célula, con el objetivo de que al disgregar a la célula todos sus transcritos se unieran a la microesfera para después secuenciarla de manera rutinaria. Con esta técnica como base se empezaron a desarrollar distintas tecnologías que permitieron secuenciar cientos de células provenientes de una muestra biológica, y ahora es posible secuenciar miles de células al mismo tiempo, lo que ha ayudado a identificar incluso poblaciones celulares que antes se desconocían. Por ejemplo, en 2020 se identificaron por primera vez células dermales indiferenciadas Hic1+ (por sus siglas en inglés gen hipermetilado en cáncer 1) que son muy similares al resto de fibroblastos dérmicos. Este tipo de células son necesarias para la regeneración de nuevos folículos después de una herida y su descubrimiento ayudó a entender el potencial de regeneración de anexos cutáneos en mamíferos (10).

Una de las grandes desventajas que tiene la scRNAseq, es que para la obtención de los datos se necesita disgregar el tejido de interés, lo que puede generar cambios de expresión asociados al proceso de aislamiento celular. Además, para ubicar en el tejido a las poblaciones celulares identificadas mediante sus perfiles transcripcionales es necesario recurrir a otras técnicas como la inmunofluorescencia o la hibridación *in situ* en donde se detectan marcadores específicos de cada población, lo que hace imposible conocer la localización espacial de todas las poblaciones celulares al mismo tiempo. En el año 2016, Stahl y colaboradores estandarizaron una técnica que consiste en generar bibliotecas génicas y bases de datos visuales de un corte histológico, para conocer al mismo tiempo los perfiles transcriptómicos y la localización espacial de las poblaciones celulares que componen al cerebro de ratón (11). En este caso, la impresión de oligonucleótidos se realizó de manera microscópica en laminillas de histología en donde se utilizan códigos únicos por microespacios dentro de un área para después distinguir zonas de un tejido a manera de coordenadas. Los resultados de esta técnica se validaron al comparar los datos espaciales de los transcritos *Doc2g*, *Kctd12* y *Penk2* con técnicas de hibridación *in situ* (para evaluar *Doc2g*) e inmunohistoquímicas (para evaluar *Kctd12* y *Penk2*). En estos experimentos se ocuparon cortes seriados de la misma área de los bulbos olfatorios del cerebro, para verificar que su patrón de expresión fuera el mismo.

Con el paso de los años, la técnica se comercializó y fue nombrada Visium. Como resultado de la estandarización y validación de esta técnica, ahora es posible que podamos estudiar los cambios transcriptómicos en función de su localización espacial que acompañan a los procesos de migración y diferenciación celular durante el desarrollo de diversos procesos fisiopatológicos como el cáncer, la regeneración y la reparación tisular. En el futuro, este conocimiento será fundamental para generar posibles estrategias que modifiquen la dinámica de ciertas

poblaciones celulares y/o sus entornos moleculares con efectos terapéuticos. Por lo anterior, en la siguiente sección te explicamos cómo funciona la técnica de Visium para la observación de la transcriptómica espacial en tejidos.

Visium: Fundamentos básicos

Para poder ubicar espacialmente el transcriptoma en un tejido son necesarios 2 pasos clave: hibridar los mRNAs de cada célula con sondas de DNA y recuperar las sondas en sitios específicos de una laminilla con oligonucleótidos de captura que llevan su propio “código de barras” (Figura 1). El primer paso consiste en colocar un corte del tejido de interés en un área de captura de una laminilla especial. Cada área de captura tiene oligonucleótidos adheridos a la laminilla y con secuencias específicas que sirven como un identificador o “código de barras espacial” que está asociado a una región específica del tejido (Figura 1A). La hibridación es similar a las técnicas ya conocidas, con la diferencia de que en lugar de ocupar una sonda para un mRNA específico, en este caso se ocupa una mezcla de sondas que reconocen a >95% de los mRNAs reportados para la especie que se esté estudiando (comercialmente sólo están disponibles para humano y ratón). De esta forma, las sondas se acoplan a todos los mRNAs expresados en cada célula, con lo que se pueden reconocer grupos de transcritos específicos de linaje y así identificar poblaciones celulares y ubicarlas en el espacio. En la Figura 1B se observa el ejemplo de la sonda A que hibrida con un transcrito que se expresa exclusivamente en la célula 1, mientras que las sondas B y C hibridan con transcritos de las células 2 y 3, respectivamente. El segundo paso consiste en que el tejido se permeabilice para que las sondas hibridadas se liberen de las células y se apareen inmediatamente con sus oligonucleótidos de captura en la laminilla, este último paso es el que dará la información necesaria para ubicar espacialmente a cada transcrito. En la Figura 1C se observa el ejemplo de la sonda A que es reconocida por los oligonucleótidos de captura de la coordenada x2/y3.

Las laminillas de Visium (10X Genomics) tienen 2 o 4 áreas de captura donde se colocan los tejidos (Figura 2). Cada área de captura está delimitada por un marco de referencia que se ocupará para orientar la fotografía del tejido. Dentro del área de captura hay cerca de 5000 microzonas (equivalentes a las coordenadas de un plano), con millones de oligonucleótidos de captura adheridos en cada una. Estos oligonucleótidos tienen 4 secuencias: Read1, un “código de barras espacial”, la secuencia UMI y un fragmento rico en timinas o PoliT (Figura 2). La secuencia Read1 se ocupa para reconocer cebadores de qPCR, permitiendo su posterior lectura en un secuenciador de DNA. El “código de barras” espacial es una secuencia de 16 nucleótidos (nt) compartida en la misma región, pero distinta para las demás, esto permite identificar el transcrito en el espacio. La secuencia UMI (de sus siglas

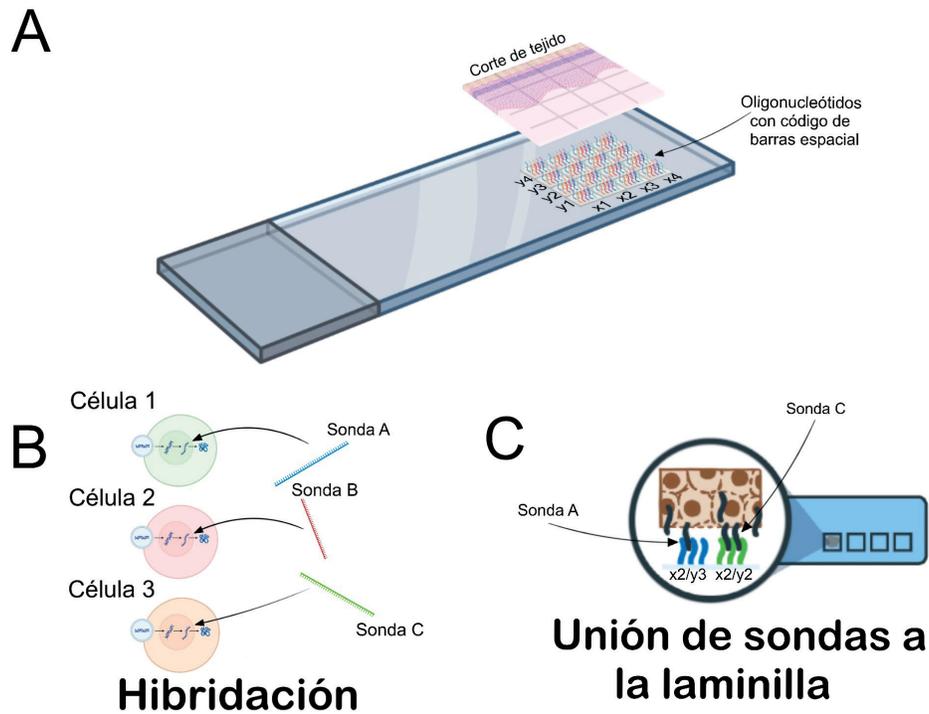


Figura 1. Principios básicos de la técnica de visualización de la transcriptómica espacial Visium. A) El corte histológico se coloca en el “área de captura” de una laminilla especial que contiene oligonucleótidos de DNA con su propio código de barras espacial. B) Se realiza una hibridación con una mezcla de sondas de DNA que reconocerán al transcriptoma de cada célula. C) Se permeabiliza el tejido para liberar a las sondas hibridadas y permitir su interacción con los oligonucleótidos de captura en la laminilla.

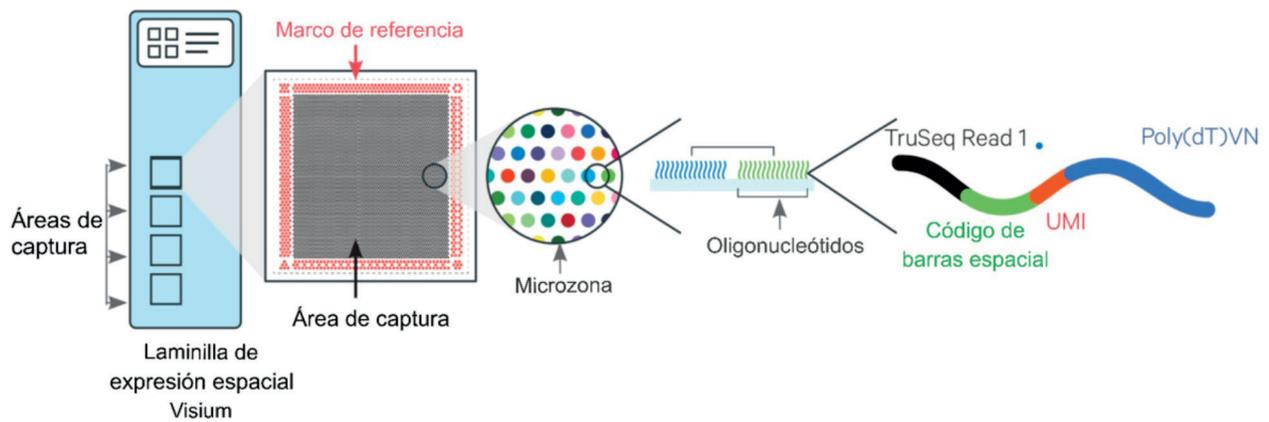


Figura 2. Modelo de una laminilla para ubicar la expresión espacial en Visium. Dentro de cada área de captura de la laminilla hay aproximadamente 5000 microzonas con millones de oligonucleótidos diseñados con cuatro secuencias específicas que permitirán el reconocimiento, la cuantificación y la ubicación espacial de cada transcrito. (Modificada de la Guía CG000407 de 10x Genomics).

en inglés *unique molecular identifier*) de 12 nt es única para cada oligonucleótido, y permite hacer una cuantificación del número absoluto de transcritos en una región. El fragmento PoliT de 30 nt se une a las colas de PoliA de los mRNAs hibridados con las sondas, esto permite la rápida unión de las sondas para que no se ubiquen en otros sitios de la laminilla (Figura 2).

La Técnica de Visium puede realizarse en cortes histológicos de tejidos frescos o de tejidos fijados y embebidos en parafina. Dependiendo del material biológico con el que se esté trabajando se deben realizar ligeros cambios a la técnica, y es importante que cada laboratorio estandarice: 1) las técnicas de corte (5 micras de grosor) y de tinción de hematoxilina y Eosina (H&E), que permitirán visualizar la estructura del

tejido y las células que lo componen; 2) la captura de la imagen en un microscopio con un programa de computadora que permita hacer una composición de fotografías a un aumento de 10x o 20x. Con esta composición se puede visualizar todo el tejido teñido con H&E y compararlo con la expresión de los transcritos en cada región del área de captura; 3) la cantidad (>10ng/μl) y la calidad del RNA (DV200 o porcentaje de fragmentos de RNA > 200 nucleótidos mayor al 50%) que se obtenga a partir de un solo corte.

Una vez que el tejido de interés se ha procesado y cortado correctamente, los cortes se colocan en una laminilla de expresión espacial y se dejan adherir al vacío durante 12 horas. En este paso es fundamental verificar que el tejido no se

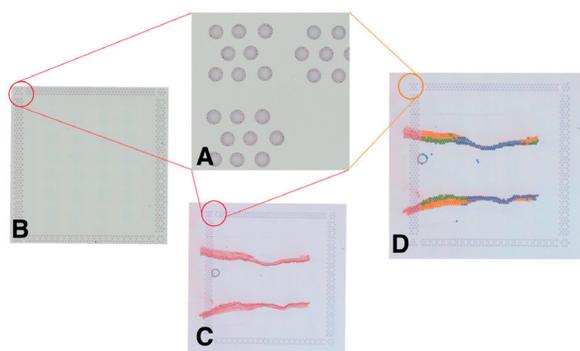


Figura 3. Orientación de las composiciones fotográficas. A) Acercamiento del patrón de puntos en la esquina superior izquierda del marco de referencia. B) Área de captura y marco de referencia. C) Ejemplo de un corte de piel de ratón teñido con la técnica de H&E. D) Imagen obtenida después de realizar la secuenciación y el análisis de los datos, se observan los patrones de expresión transcripcional y la distribución espacial de distintas poblaciones celulares. Imágenes obtenidas en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo del INRLGII.

despegue de la laminilla, de lo contrario no se podrá realizar la localización espacial de los transcritos. Posteriormente, se realizan la tinción de H&E y las composiciones fotográficas ocupando el patrón de puntos de la esquina superior izquierda del marco de referencia como orientación (Figura 3).

Para obtener la información del transcriptoma de cada región del tejido en la laminilla se requiere generar bibliotecas génicas y después secuenciarlas, para lo que se tienen que seguir una serie de reacciones moleculares que consisten en: 1) hibridar los pares de sondas, estas son secuencias de DNA prefabricadas con fragmentos LHS (del inglés *left-hand side*) y RHS (del inglés *right-hand side*) que por complementariedad de bases reconocerán a cada transcrito dentro de una célula; 2) ligación, una vez que las sondas reconocen a sus mRNAs blanco, ambas sondas se unen en una reacción de ligación con una enzima ligasa; 3) liberación de la sonda, para lo que se requiere de un tratamiento con RNAsa y de la permeabilización del tejido. Como resultado

se liberan sólo los productos de ligación (con cola PoliA) de una sola hebra de DNA. En este momento se pierde la integridad del tejido y las reacciones siguientes ocurren directamente en la laminilla; 4) captura, en donde las sondas liberadas se aparean inmediatamente con los oligonucleótidos de captura (que se describieron previamente). Una vez unidas a la laminilla, se realiza extensión de doble cadena para que las sondas (con las secuencias de localización espacial) tengan mayor estabilidad molecular. Así se pueden separar de la laminilla en forma de elución, para que el resto de las reacciones se puedan realizar en un tubo de PCR (Figura 4). A partir de este momento, la generación de las bibliotecas génicas es el mismo que para la secuenciación convencional.

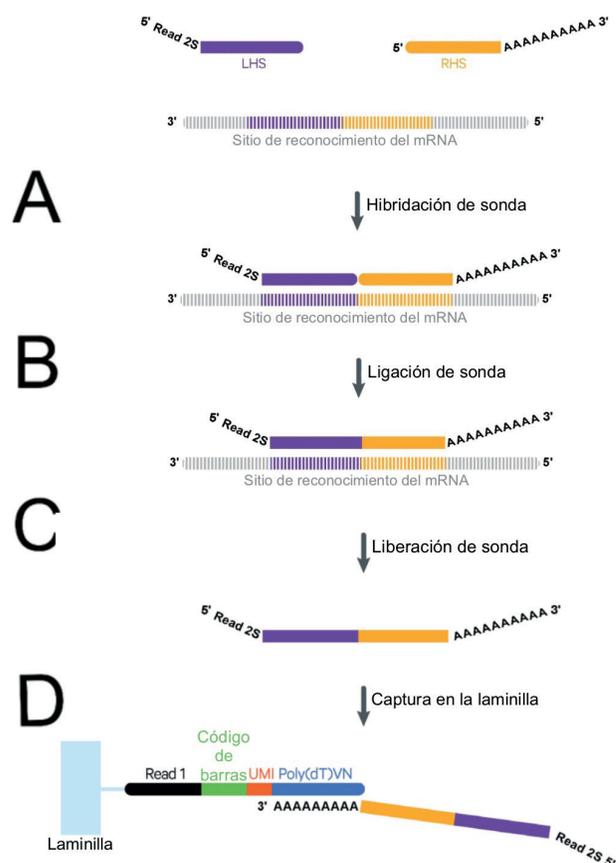


Figura 4. Captura espacial de sondas a partir de la hibridación del transcriptoma. Cada mRNA es reconocido específicamente por su sonda LHS en el extremo 3' y una sonda RHS con secuencia PoliA en el extremo 5'. A) Hibridación: las sondas reconocen a su mRNA. B) Ligación: las sondas LHS y RHS se unen mediante una enzima ligasa. C) Liberación: Se abren poros en la membrana celular y permiten la salida de la sonda. D) Captura: La sonda en su extremo PoliA es reconocida en la región PoliT de un oligonucleótido de la serie de microzonas espaciales en la laminilla Visium. (Modificada de la Guía CG000407 de 10x Genomics).

A manera de resumen, en la Figura 5 presentamos el esquema general de trabajo para obtener bibliotecas génicas y realizar la visualización de la transcriptómica espacial en un corte de tejido.

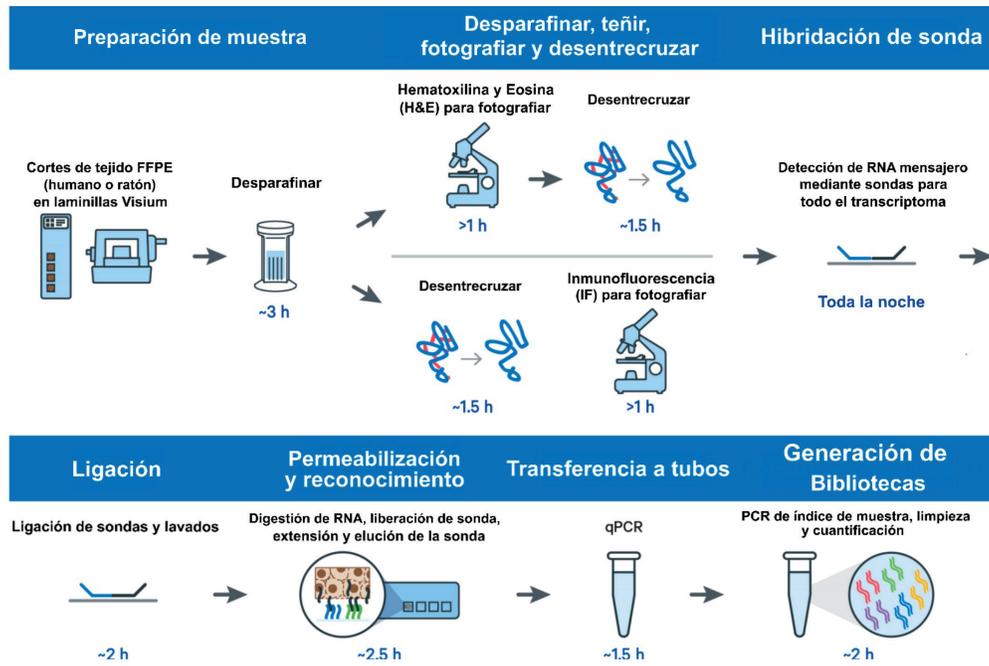


Figura 5. Esquema general de trabajo para la obtención de bibliotecas génicas mediante la técnica de Visium. Se muestran los tiempos aproximados que se requieren para cada paso experimental. (Modificada de la Guía CG000404 de 10x).

Procesamiento Bioinformático de los datos de Visium

La transcriptómica espacial, al igual que la scRNAseq, adiciona una nueva dimensión a las tecnologías de secuenciación de nueva generación, por lo que el análisis bioinformático es fundamental para descryptar los datos y poder representar la expresión de los genes en el espacio. Antes y durante el proceso de secuenciación se generan dos tipos de datos: la imagen del tejido y los datos de secuenciación. La información de la imagen y secuencias son preprocesadas bioinformáticamente para generar la matriz de conteo de los transcritos, en donde las filas son los genes y las columnas los “códigos de barras espaciales” denotando la cantidad de veces que se detectó el gen en esa zona del tejido. 10x Genomics ya cuenta con su conjunto de análisis y herramientas conjugadas en lo que llama *Space Ranger* para preprocesar los datos. De manera inicial descompone los archivos nativos de los secuenciadores de Illumina en archivos FASTQ, posteriormente se hace el alineamiento de las secuencias con respecto a un genoma de referencia (i.g. humano o ratón) para así poder decodificar la secuencia de nt en genes. Ya obtenido el alineamiento, a la imagen del tejido se le somete a un limpiado mediante procesamiento de imágenes en donde se identifican las microzonas por sus “códigos de barras espaciales” y se filtran aquellas zonas en donde no hay tejido sobrepuesto. Estos mismos pasos pueden realizarse de manera independiente a *Space Ranger*, sólo se debe cuidar la correlación entre los datos de las secuencias y la imagen (Figura 6).

Ya obtenidas las matrices de conteo se realiza el procesamiento de los datos, que de manera inicial debe de asegurar la calidad de los datos mismos. La calidad se relaciona a que cada columna que refiere al conteo en cada región tenga al menos 1000 genes expresados y menos del 5% de esos genes correspondan a RNA mitocondrial, ya que un porcentaje más alto es indicador de apoptosis celular. Por otro lado, si es que se quiere utilizar muestras de diferente procedencia o datos generados en corridas diferentes del secuenciador es necesario hacer una corrección para que los datos sean comparables en sus diferencias biológicas y no en las variaciones técnicas. El siguiente paso para asegurar la comparabilidad de los datos es normalizar los datos de acuerdo con el conteo de RNA de cada región, con el objetivo de poder comparar estadísticamente zonas con bajo y alto conteo de RNA, por ejemplo: zonas fibróticas versus zonas con infiltrado inflamatorio. *SCnorm* normaliza en función de cuantiles del nivel expresión de acuerdo con la profundidad alcanzada en cada región (12). Es importante denotar que no existe un método estándar, y que en algunos casos no es recomendable la normalización. Pasando al análisis, como primer paso es la identificación de los tipos celulares y caracterizar la heterogeneidad de la muestra. Este proceso inicia con la proyección de los datos en un plano bi o tridimensional, con esto se identifican microzonas con perfiles de expresión similares. Hay que resaltar que en la matriz de conteo cada gen representa una dimensión de información, por lo que establecer relaciones y similitudes es propenso a errores, lo que se optimiza a bajas dimensiones. Las proyecciones más comunes son t-SNE y uMAP (13, 14).

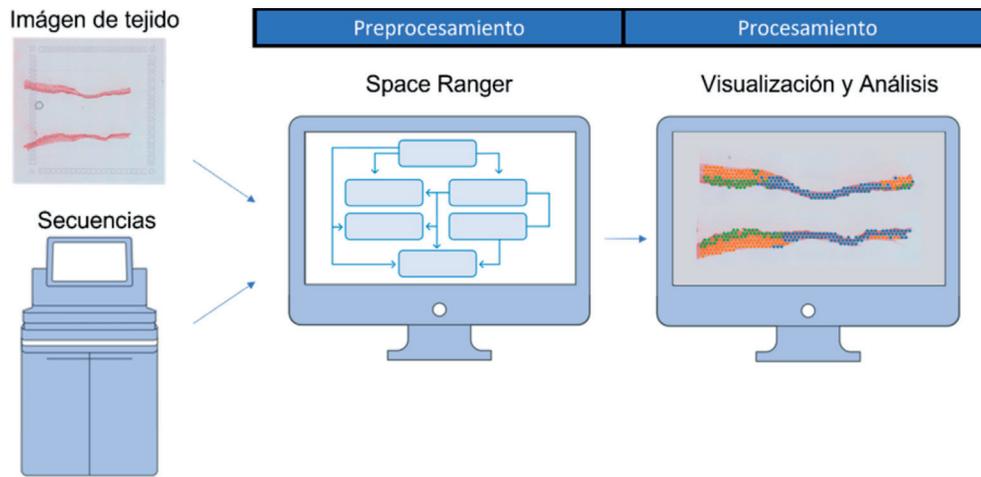


Figura 6. Análisis bioinformático de los datos de la transcriptómica espacial derivado de la tecnología Visium. De manera general consta de dos partes: 1) El preprocesamiento para generar la matriz de conteo, 2) El análisis de la matriz para la extracción de información biológica, desde filtrado de calidad, normalización, proyección, agrupamiento, identificación de tipos celulares, descomposición de las distribuciones mixtas y búsqueda de interacciones (Modificada de la Guía BR060 de 10x).

uMAP tiene la ventaja de poder proyectar en más de una dimensión, se recomienda como paso previo hacer PCA (de las siglas en inglés *Principal Component Analysis*) y usar alrededor de más de 10 componentes para obtener información suficiente del fenómeno biológico. Utilizando la proyección de los datos se aplica un método de agrupamiento, los más usados que no tienen dependencia de la geometría de la proyección o consideraciones de normalidad son los métodos de agrupamiento aglomerativo (e.g. métodos de Leiden y Louvain) en donde a través de iteraciones se van juntando muestras que tienen perfiles de expresión similares (15). Posteriormente, se hace un análisis de expresión diferencial para encontrar los genes que distinguen a cada grupo asociado a un subtipo celular, por ejemplo, mediante *scran* (16). Para la identificación se utilizan dos estrategias: 1) los genes marcadores se contrastan con bases de datos para inferir el tipo celular con herramientas como *Scmap*, *singleR*, *CIBERSORT* (17–18) y 2) los genes marcadores se contrastan con listas curadas por expertos en el tema. Es importante recordar que tener la información de los grupos de células y su posición en el tejido, nos permite conocer su distribución espacial y sus patrones de expresión espaciales, lo que es relevante en procesos como el cáncer (19,20) y la reparación de tejidos. Sin embargo, una limitante de la técnica es que cada región caracterizada en Visium mide cerca de 55µm de diámetro, por lo que la resolución espacial no es de una sola célula sino de un grupo de 2-7 células (dependiendo del tejido) que si son del mismo tipo tendrán un perfil de expresión comparable, sin embargo, si es una mezcla de diferentes tipos celulares tendrán un perfil de expresión con distribución mixta.

Para tener una aproximación de resolución a células individuales es posible acoplar datos de scRNAseq del mismo tejido que contengan las poblaciones descritas en su contraparte espacial. Los datos de célula única permiten conocer las distribuciones de expresión de las poblaciones de tipos celulares de manera aislada, tomando estas distribuciones se construyen distribuciones mixtas que contemplen todas las combinaciones posibles de subtipos celulares. Usando un análisis de correlación en un modelo semisupervisado se descomponen las distribuciones mixtas de análisis espacial y se asocian las distribuciones marginales (21). Con el avance de la tecnología, nuevas herramientas como Xenium permiten conocer, a resolución de célula única, la distribución espacial del perfil de expresión de células mediante la técnica de hibridación *in situ*; sin embargo, se debe tener en cuenta que esta técnica aún limita la cantidad de genes a observar (cerca de 250). Finalmente, los datos de la transcriptómica espacial también nos permiten realizar la búsqueda de interacciones de actividad en las localidades espaciales del tipo célula-célula y ligando-receptor para construir vías de comunicación celular. Para este fin, *Giotto* considera la proximidad entre las células para determinar la interacción espacial de acuerdo con las proximidades (23). De manera similar funciona *SpaOTsc* minimizando una función objetivo de las diferencias de expresión entre los diferentes subtipos celulares, particularmente para interacciones ligando-receptor hace una descomposición parcial de los perfiles para aproximar la interacción gen-gen (22). Con los datos generados de manera masiva, la transcriptómica espacial nos permite analizar la relación, la interacción y la distribución espacial a escala celular de un tejido en específico.

Así, ellos definieron 4 grandes poblaciones de fibroblastos con perfiles de expresión de mRNAs, localización espacial y patrones de activación y migración específicos. En las etapas más tempranas del proceso cicatrizal, los fibroblastos “activados por respuesta” son los primeros en iniciar programas transcripcionales de repuesta a la herida, seguidos por los “fibroblastos mecanofibróticos” (RUNX1+) que se empiezan a diferenciar en respuesta a las señales de mecanotransducción, a migrar hacia el centro de la herida y a interactuar con macrófagos SPP1+ (los mismos que se observan en cáncer) activando así programas fibróticos (Col1a1 y MSR1). Finalmente, los fibroblastos “proliferadores” y “remodeladores” aparecen en los tiempos más tardíos y son los más relacionados con la regeneración de estructuras dérmicas (26). Estos resultados demostraron que los fibroblastos responden de una manera muy dinámica al microambiente cicatrizal que se genera en la herida, y que modular sus caminos de diferenciación puede ser una pieza clave para definir estrategias terapéuticas que reduzcan la fibrosis y promuevan la regeneración de la dermis (Figura 7C).

Nuestro Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Centro de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ) del Instituto Nacional de Rehabilitación, es el primer grupo en México que está implementando la tecnología de Visium

con el objetivo de explorar la dinámica de respuesta celular en el proceso de cicatrización de quemaduras de segundo grado profundo. Este estudio se encuentra actualmente en desarrollo y con él buscamos tener una comprensión más general sobre las respuestas adaptativas de las células al microambiente ocasionado por una quemadura, que es distinto al que se genera en otro tipo de heridas. Con el conocimiento de los perfiles transcripcionales, y los patrones de migración de fibroblastos, células inflamatorias y células de la epidermis, estaremos en la posibilidad de pensar en futuras estrategias terapéuticas dirigidas que mejoren la evolución de las cicatrices fibróticas de los pacientes con quemaduras graves.

Agradecimientos

El análisis de la dinámica celular durante la cicatrización de una quemadura grave se está realizando en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” y es un proyecto financiado por el CONACyT (FORDECYT-PRONACES/2096009/2020). Este trabajo se desarrolló parcialmente durante la estancia posdoctoral de la Dra. Mandujano-Tinoco financiada por el CONACyT-CCINSHAE 2022 I1200/320/2022. El resumen gráfico y las figuras 1 y 6 de este artículo fueron creadas con BioRender.

Referencias

- Garrod, A. E. (1923) *Inborn errors of metabolism*. H. Frowde and Hodder & Stoughton.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953) Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-738.
- Gall, J. G., & Pardue, M. L. (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Ac. Sci.* **63**, 378-383.
- Knipple, D. C., Seifert, E., Rosenberg, U. B., Preiss, A., & Jäckle, H. (1985) Spatial and temporal patterns of Krüppel gene expression in early Drosophila embryos. *Nature*, **317**, 40-44.
- Levy, S., Sutton, G., Ng, P. C., Feuk, L., Halpern, A. L., Walenz, B. P., et al. (2007) The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol.* **5**, e254.
- Velculescu, V. E., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2000) Analysing uncharted transcriptomes with SAGE. *Trends Genet.* **16**, 423-425.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676.
- Bainbridge, M. N., Warren, R. L., Hirst, M., Romanuik, T., Zeng, T., Go, A., et al. (2006) Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. *BMC genomics*, **7**, 1-11.
- Islam, S., Kjällquist, U., Moliner, A., Zajac, P., Fan, J. B., Lönnerberg, P., et al. (2011) Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res.* **21**, 1160-1167.
- Abbasi, S., Sinha, S., Labit, E., Rosin, N. L., Yoon, G., Rahmani, W., et al. (2020) Distinct regulatory programs control the latent regenerative potential of dermal fibroblasts during wound healing. *Cell Stem Cell.* **27**, 396-412.
- Stähl, P. L., Salmén, F., Vickovic, S., Lundmark, A., Navarro, J. F., Magnusson, J., et al. (2016) Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*, **353**, 78-82.
- Bacher, R., Chu, L.-F., Leng, N., Gasch, A. P., Thomson, J. A., Stewart, R. M., et al. (2017) SCnorm: robust normalization of single-cell RNA-seq data. *Nat. Methods.* **14**, 584-586
- van der Maaten, L., and Hinton, G. (2008) Visualizing Data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* **9**, 2579-2605
- McInnes, L., Healy, J., and Melville, J. (2018) UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. *10.48550/arXiv.1802.03426*
- Traag, V. A., Waltman, L., and van Eck, N. J. (2019) From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. *Sci. Rep.* **9**, 5233
- Lun, A. T. L., McCarthy, D. J., and Marioni, J. C. (2016) A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. *F1000Res.* **5**, 2122
- Kiselev, V. Y., Yiu, A., and Hemberg, M. (2018) scmap: projection of single-cell RNA-seq data across data sets. *Nat. Methods.* **15**, 359-362
- Aran, D., Looney, A. P., Liu, L., Wu, E., Fong, V., Hsu, A., et al. (2019) Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat. Immunol.* **20**, 163-172
- Chen, B., Khodadoust, M. S., Liu, C. L., Newman, A. M., and Alizadeh, A. A. (2018) Profiling tumor infiltrating immune cells with CIBERSORT. *Methods Mol. Biol.* **1711**, 243-259
- Muciño-Olmos, E. A., Vázquez-Jiménez, A., Avila-Ponce de León, U., Matadamas-Guzman, M., Maldonado, V., López-Santaella, T., et al. (2020) Unveiling functional heterogeneity in breast cancer multicellular tumor spheroids through single-cell RNA-seq. *Sci. Rep.* **10**, 12728
- Kipf, T. N., and Welling, M. (2016) Semi-Supervised Classification with Graph Convolutional Networks. *10.48550/arXiv.1609.02907*

22. Dries, R., Zhu, Q., Dong, R., Eng, C.-H. L., Li, H., Liu, K., et al. (2021) Giotto: a toolbox for integrative analysis and visualization of spatial expression data. *Genome Biol.* **22**, 1–31
23. Cang, Z., and Nie, Q. (2020) Inferring spatial and signaling relationships between cells from single cell transcriptomic data. *Nat Commun.* 10.1038/s41467-020-15968-5
24. Chen, S., Chang, Y., Li, L., Acosta, D., Li, Y., Guo, Q., et al. (2022) Spatially resolved transcriptomics reveals genes associated with the vulnerability of middle temporal gyrus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* **10**, 1-24.
25. Qi, J., Sun, H., Zhang, Y., Wang, Z., Xun, Z., Li, Z., et al. (2022) Single-cell and spatial analysis reveal interaction of FAP+ fibroblasts and SPP1+ macrophages in colorectal cancer. *Nat. Commun.* **13**, 1742.
26. Foster, D. S., Januszyk, M., Yost, K. E., Chinta, M. S., Gulati, G. S., Nguyen, A. T., et al. (2021) Integrated spatial multiomics reveals fibroblast fate during tissue repair. *PNAS.* **118**, 10.1073/pnas.2110025118.



DRA. EDNA AYERIM MANDUJANO TINOCO
ORCID 0000-0002-0026-5880

Edna Ayerim Mandujano Tinoco es Bióloga de formación y Doctora en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México. Realizó su trabajo doctoral en el Laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Medicina Genómica estudiando la expresión y función de microRNAs en un modelo tridimensional de cáncer de mama. Es Investigadora asociada del Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados en el Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, en donde su principal interés es estudiar las dinámicas celulares asociadas a cambios transcriptómicos durante el proceso de reparación de la piel después de una quemadura grave. En 2021 recibió financiamiento de CONACyT para introducir la secuenciación de célula única y la transcriptómica espacial en el estudio de las quemaduras. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel I, y ha publicado 19 artículos científicos internacionales y 2 capítulos de libros con más de 500 citas. Recientemente obtuvo una beca del CONACyT para realizar una estancia posdoctoral en la Universidad de Calgary en donde está estudiando cómo ciertas interacciones entre fibroblastos y células inmunes pueden promover la regeneración de la piel.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 122-127

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Lo que el pez cebra nos ha enseñado sobre el betaglicano, un misterioso co-receptor del Transforming Growth Factor beta.

What we have learnt about betaglycan, an intriguing TGFβ co-receptor, from the zebrafish.

López-Casillas, Fernando^{1*}; Molina-Villa, Tonatiuh¹; Ramírez-Vidal, Lizbeth¹; Morales-Ramírez, Elena¹; Morales-Villafaña, Gilberto¹ y Mendoza-Rodríguez, Valentín¹.

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Correspondencia: Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Cto. Exterior s/n, C.U., Coyoacán, CP. 04510, CDMX, México. Tel: (+52)556225625, fcasilla@ifc.unam.mx

Resumen

Aun después de 30 años de su clonación, el betaglicano, también conocido como TGFBR3 (receptor tipo 3 del Transforming Growth Factor beta, TGFβ) sigue presentando enigmas que lo hacen un desafiante tema de investigación. Los datos de bioquímica y biología celular sugerían funciones moduladoras, “accesorias”, de sus múltiples ligandos. Sin embargo, la creación de ratones nulos para el gen del betaglicano reveló que su ausencia era capaz de causar letalidad embrionaria. Con el propósito de ahondar en las actividades *in vivo* del receptor, abordamos el estudio de su gen en el pez cebra, encontrando que la situación es todavía más compleja en este vertebrado. Los peces morfantes (*knock-down*) exhiben letalidad embrionaria, con fenotipos exuberantes, en cambio los peces nulos (*knock-out*) tiene fenotipos discretos y no letales. Estos resultados revelan una funcionalidad *in vivo* del receptor que depende mucho más que de su simple presencia o ausencia. El reduccionista “blanco y negro” del tubo de ensayo se torna en una “paleta de grises” en el animal vivo. Dependiendo del momento y lugar de su presencia y aunado al “contexto” celular-tisular, el betaglicano matiza de diversas formas las respuestas homeostáticas, fisiopatológicas y del desarrollo.

Palabras clave: betaglicano, TGFβ, TGFBR3, pez cebra, desarrollo embrionario, transducción de señales.

Abstract

Even after 30 years from its cloning, betaglycan, also known as type 3 Transforming Growth Factor beta TGFβ receptor (TGFBR3), is still a challenging topic of biomedical research. Biochemical and cell biology results suggested it had only modulatory “accessory” functions. The study of null betaglycan gene mice revealed an embryonic lethal phenotype. With the purpose of gaining a deeper insight of its functions we set up to study zebrafish betaglycan, finding a more complicated scenario in this vertebrate. Morphant (*knock-down*) fishes had exuberant embryonic lethal phenotypes, however, betaglycan null fishes (*knock-out*) showed only non-lethal discrete phenotypes. These contrasting results indicates that the *in vivo* functions of betaglycan depend on something more complex than its sole absence or presence in the organism. The reductionist black and white view from the test tube experiment becomes a grey-scale palette in the intact animal. Depending on the time and place of its expression, as well as on the cellular “context”, betaglycan modulates in diverse manners physiological, pathophysiological and developmental responses.

Keywords: betaglycan, TGFβ, TGFBR3, zebrafish, embryonic development, signal transduction.

Betaglicano *in vitro*, lo que la bioquímica y la biología celular nos han enseñado.

El betaglicano (BG), también llamado el receptor 3 del TGF- β (TGFBR3) fue descubierto en los años 80 del siglo pasado gracias a experimentos de marcaje por afinidad de células en cultivo de tejido (1). Estos experimentos se hicieron con el propósito de identificar a los receptores membranales que mediaban las respuestas del recién descubierto factor de crecimiento celular, el TGF- β , el cual tiene la notable peculiaridad de ser un inhibidor de la proliferación celular, contrariamente a lo que la gran mayoría de otros factores celulares hacen. La sola posibilidad de estudiar al TGF- β y sus mecanismos anti-mitogénicos alentaba la esperanza de encontrar blancos terapéuticos contra el cáncer. Para lograr esta meta, se requería conocer la vía de transducción del TGF- β . La técnica de marcaje por afinidad con ligandos radioactivos, que había demostrado su poder para determinar la estructura del receptor de la insulina, fue aplicada en células sensibles e insensibles (obtenidas mediante mutagénesis química) al TGF- β , revelando 3 diferentes glicoproteínas transmembranales que por su tamaño se denominaron receptores tipo 1, 2 y 3. Mediante una elegante serie de experimentos con híbridos somáticos de estas células mutantes, marcaje por afinidad y rescate de las respuestas anti-proliferativas mediadas por TGF- β , se concluyó que los receptores 1 y 2 eran indispensables para los efectos del factor (2). Esta propuesta fue corroborada con la clonación de los cDNAs de los receptores, añadiendo que estos eran cinasas de serina y treonina que se asociaban en presencia del ligando. Sin mucha demora, se estableció también que la activación del receptor 1, debida a su fosforilación por el receptor 2, constituía el inicio de la llamada vía canónica del TGF- β (3).

Mientras el TGFBR1 y el TGBR2 y las Smads se revelaban como los engranajes de la vía canónica, la estructura del betaglicano, deducida de su clonación (4), confirmaba las predicciones bioquímicas (5) revelándose como un abundante proteoglicano transmembranal, con glicosaminoglicanos de heparan y condroitin sulfato (GAGs de HS y CS), capaz de unir a las tres isoformas del TGF- β con alta afinidad y cuyo ectodominio podía ser liberado de la membrana mediante un corte proteolítico (shedding) dando lugar a un receptor “soluble” (6,7). Sin embargo, la estructura no indicó ninguna función de señalamiento evidente. Mediante la transfección del betaglicano en células carentes del co-receptor pero con receptores 1 y 2, se descubrió que las respuestas a la isoforma TGF- β_2 , se potenciaban, siendo comparables a las de las otras isoformas (8). Esta equipotenciación se lograba gracias a que el receptor 2 se asociaba con el betaglicano y el TGF- β_2 , en lo que se denominó “complejo de presentación de ligando”, el cual compensa la baja afinidad que el receptor 2 tiene por el TGF- β_2 (9,10). Este hallazgo, uno de los primeros cuyo mecanismo ha sido estudiado a nivel molecular y estructural (11), ha sido confirmado extensamente y ha sentado un

paradigma para la función de los co-receptores en general. Sin embargo, no es el único caso en el que el betaglicano interactúa con un ligando de la familia del TGF- β y decide sus efectos sobre los receptores de señalamiento. La búsqueda del receptor de la inhibina terminó cuando el grupo de Vale demostró que la inhibina A forma un complejo con el betaglicano y el receptor tipo 2 de la activina, impidiendo que este último se asocie con la activina y el receptor tipo 1. Este “secuestro” es otro ejemplo de cómo el betaglicano forma complejos mediados por ligando con receptores de señal y en este caso resulta en la inactivación de la activina, revelando el mecanismo en como la inhibina funciona como su antagonista fisiológico (12-14).

Aunque la existencia del betaglicano soluble se conocía desde antes de su clonación (6), su función pudo probarse con la producción de una forma recombinante en células de insecto (7,15). Aunque el betaglicano soluble tiene las mismas propiedades de unión de ligando que el ectodominio de su precursor membranal, existe una diferencia fundamental, la versión soluble actúa como un anticuerpo antagonista del TGF- β (9,15). Esto, aunado con el hecho de que el “shedding” del betaglicano soluble es un proceso regulado fisiológicamente (16), nos llevó a proponer que el betaglicano podría funcionar *in vivo* como un “switch” que, dependiendo de su ubicación topológica (membranal o soluble), activaba o apagaba las acciones del TGF- β (17). En principio, si fuese posible encontrar la manera de regular *in vivo* la producción de la forma soluble a partir de la forma membranal, se podrían mitigar los efectos nocivos que la sobreproducción del TGF- β tiene en muchas enfermedades de importancia humana, como el cáncer, la diabetes y la tuberculosis, en las cuales hemos demostrado, usando modelos animales, el gran potencial terapéutico del betaglicano soluble recombinante (18-20).

En resumen, el TGFBR3 o betaglicano es un co-receptor con muchas capacidades, las cuales aún no han sido completamente estudiadas. Una asignatura pendiente es la función de las cadenas de glicosaminoglicanos de heparan y condroitin sulfato (GAGs de HS y CS). Es bien conocido que estos carbohidratos complejos tienen capacidad para unir factores de crecimiento celular y quimiocinas (21) y que los heparan sulfato del betaglicano unen FGF (22), sin embargo aún se desconoce la verdadera relevancia fisiológica de esta interacción. Otra asignatura pendiente es la función de la región citoplasmática, la cual está altamente conservada entre todos los ortólogos del betaglicano y de la endoglin (23,24). Esta región bien podría servir como “plataforma” de unión y de regulación para proteínas intracelulares, como ya se ha demostrado para la beta-arrestina (25).

Un aspecto intrigante del TGF- β es su participación en la oncogénesis, pues como en casi todos los efectos del factor, dos lados coexisten, “el bueno y el malo” (26). El TGF- β por su naturaleza antimitogénica funciona deteniendo la proliferación cancerosa, pero debido a que las células tumorales suelen perder componentes de la vía canónica,

el factor puede operar como un promotor del proceso oncogénico, en especial las metástasis (26). De ahí que inhibir al TGF- β para tratar el cáncer sea una meta compleja, pues dependiendo de muchas cosas, dicha inhibición podría ser benéfica o no. La notable capacidad del betaglicano soluble recombinante para inhibir al TGF- β sirvió para demostrar que en ciertos tipos de tumor y en ciertas situaciones del proceso oncogénico funciona como un poderoso agente antitumoral (18). Como se podrá imaginar, la localización del betaglicano, soluble o membranar, podía ser, en principio, un factor determinante de si el TGF- β muestra su lado bueno o malo en el cáncer y otras patologías (16).

En resumen, es claro que el betaglicano es un co-receptor con infinidad de posibilidades funcionales, derivadas principalmente de su exuberante estructura modular, las cuales in vivo podrían actuar de manera independiente una de la otra, lo que, en cierta forma anticipa la pleiotropía de fenotipos embrionarios que han mostrado los animales en los que se han hecho *knock-downs* o *knock-outs* de su gen.

Betaglicano *in vivo*, lo que los modelos animales nos han enseñado.

No obstante, sus múltiples funciones bioquímicas, el betaglicano mantuvo su reputación de co-receptor accesorio y no fue sino hasta que se publicaron los fenotipos letales embrionarios de los ratones nulos que esa idea fue cambiando (27-29). Los ratones *knock-out* del TGFBR3 mueren a la mitad de la gestación debido a una deficiente proliferación miocárdica, defectos de los vasos coronarios, y de las válvulas cardíacas y las de los grandes vasos. Además, presentan apoptosis hepática la cual posiblemente ocasione la concomitante hematopoyesis deficiente. Aun sabiendo que el betaglicano se expresa en músculo esquelético y cardíaco (29,30), y que su bloqueo con anticuerpos neutralizantes, en explantes de cojinetes atrio-ventriculares de embriones de pollo, impedía la correcta transición epitelio-mesenquimatoso endotelial (31), el fenotipo murino fue sorprendente por su letalidad y amplitud, dejando en claro que el betaglicano es un co-receptor indispensable durante el desarrollo embrionario murino. Los mecanismos moleculares que conducían a estos defectos se atribuyeron a una incapacidad de estos ratones para equipotenciar al TGF- β_2 , es decir, a una defectuosa señalización de esa isoforma (29). Sin embargo, a pesar de que el ratón nulo para el TGF- β_2 tiene ciertos rasgos semejantes al del TGFBR3 (32), no es su fenocopia fiel, de ahí que se puede concluir que la deficiente señalización por el TGF- β_2 no es la sola responsable del fenotipo del TGFBR3. De hecho, como se discutió en la sección previa, es claro que el betaglicano tiene un repertorio de funciones bioquímicas mucho más extenso, las cuales podrían contribuir con diversos aspectos del fenotipo. El ratón nulo para el TGFBR3 también confirmó las limitaciones que tienen los experimentos *in vitro* y en cultivo de tejidos para entender cabalmente la función de este co-receptor y que para ello

es necesario usar abordajes genéticos en ratón y pez cebra. Un ejemplo sobresaliente es el descubrimiento de como la inhibina A y la B funcionan separadamente para regular la función reproductora en ratones. Parte importante del ciclo estral es la maduración de ovocitos por efecto de la FSH (hormona folículo estimulante) producida por la estimulación con activina de los gonadotropos hipofisarios (33). La FSH también estimula la producción de las inhibinas A y B en el ovario, hormonas que bloquean en la hipófisis la acción de la activina, creando un ciclo de retroalimentación negativa para la óptima función reproductora. La creación del ratón nulo, gonadotropo-específico, para betaglicano solo perdió sensibilidad a la inhibina A, llevando a la identificación de un nuevo co-receptor emparentado estructural y funcionalmente con el betaglicano y que era mediador de los efectos de la inhibina B. Este nuevo gen codifica una proteína semejante al betaglicano (TGFBR3L) pero que posee solo un dominio ZPC de unión a la inhibina que tiene una selectividad para la isoforma B (33). Es claro que los estudios en animal completo han revelado lo mucho que aún hay por descubrir para este co-receptor.

El betaglicano del pez cebra complica las ideas sobre este co-receptor.

El pez cebra, *Danio rerio*, es un modelo que ha ganado prominencia en la investigación biomédica debido a sus ventajas sobre el ratón, especialmente el hecho de que sus embriones son transparentes y se desarrollan fuera de la madre, lo que permite su observación directa en tiempo real, segundo tras segundo. Además, el hecho de que se pueden modificar genéticamente tras ocurrir la fertilización permite detectar con facilidad, en lapsos cortos, si la manipulación de algún gen causa alteraciones fenotípicas muy particulares. Hoy en día, gracias a las herramientas proporcionadas por *CRISPR-Cas*, es sin duda el vertebrado ideal para hacer genética y debido a su gran similitud con el genoma humano, es factible generar información aplicable a los humanos. La clonación del TGFBR3 en esta especie demostró una gran conservación estructural con los ortólogos mamíferos (34). Además de tener la misma estructura modular conservada, se expresa también como un proteoglicano de membrana con alta afinidad para el TGF- β_2 y su gen exhibe el mismo patrón exónico-intrónico con promotores semejantes en secuencia y actividad (35), todo lo cual auguraba funciones muy conservadas en todos los vertebrados, que deberían ser fáciles y rápidamente estudiadas en el pez.

La pregunta inmediata e importante era determinar si el betaglicano del pez, como en el ratón, es un gen indispensable para el desarrollo embrionario. Con ese fin, usamos “morfolinos”, un abordaje experimental muy usado en el pez cebra para apagar la expresión de un gen específico (“*knock-down*”, KD). Los morfolinos son análogos de polinucleótidos anti-sentido, no hidrolizables, con secuencias de bases capaces de hibridar por complementariedad sobre blancos

específicos, bloqueando la traducción de un mRNA, o el splicing de un pre-mRNA (36). Estos experimentos indicaron que la reducción, casi total, en la expresión del betaglicano ocasionaba letalidad embrionaria y defectos en el desarrollo que incluían diversos órganos (34). Uno de estos defectos era en la formación de nuevos vasos sanguíneos, en particular el acortamiento de los brotes angiogénicos de la aorta dorsal y el plexo caudal venoso. Este “fenotipo angiogénico” era inesperado y muy atractivo, pues el betaglicano no se expresa en los vasos sanguíneos del pez, ni de los mamíferos. En esas estructuras, en cambio, se expresa el otro co-receptor del TGF- β , la endoglina, la cual si tiene fenotipos vasculares en mamíferos y el pez (24,37). El hecho de que el betaglicano se exprese abundantemente en los músculos somíticos que rodean a los brotes angiogénicos afectados, sugiere que se trata de un efecto indirecto, a través de un mecanismo no autónomo celular que emergía como un nuevo enigma en la saga del betaglicano (34,35). Lo inesperado del fenotipo vascular obligó a validar minuciosamente su especificidad con todo tipo de controles (34), y por supuesto, a crear un pez mutante nulo para estudiarlo cabalmente. Dicho *knock-out* (KO) se obtuvo mediante las poderosas herramientas del CRISPR-Cas9 y arrojó otra sorpresa, el fenotipo angiogénico no se presentaba en los peces nulos para el gen de TGFBR3 (38). De hecho, el pez nulo no parece reproducir ninguno de los fenotipos observados en el morfante y se desarrolla sin aparentes defectos, llega a la vida adulta y es fértil. Esta discrepancia entre fenotipos KD y KO se ha vuelto común en el pez cebra, como lo atestigua un extenso estudio en que comparan los morfantes (KD) y los mutantes (KO) de varios genes (39). Para alguno de estos casos discrepantes se ha encontrado una explicación, la compensación genética mediada por la sobre expresión de algún gen semejante al mutado, que pueda reemplazarlo funcionalmente (40), lo cual ha abierto un campo de estudio para intentar explicar los mecanismos de este fenómeno (41). Esa compensación, se hipotetiza, solo ocurre en el mutante nulo, y no en el morfante, debido a que este último el apagamiento del gen blanco ocurre inmediatamente después de administrar el morfolino, sin dar tiempo a la instalación de los mecanismos compensatorios, los cuales pueden arrancar durante las generaciones que pasan entre tener un mutante mosaico y el pez nulo en los dos alelos del gen. En nuestro laboratorio estamos indagando la posibilidad de que la endoglina, o algún otro gen, pueda estar compensado la falta del betaglicano en el pez mutante.

Sin embargo, con el pez nulo generado se hizo una búsqueda de fenotipos no evidentes a primera inspección en los órganos y tejidos que muestran una expresión embrionaria elevada de betaglicano. Gracias a ese enfoque se encontró que la falta de betaglicano causa un retraso en la mineralización de los cordocentros, estructuras anulares que se forman alrededor de la notocorda y que sirven de precursores para las vértebras. Este retraso es semejante al observado con inhibidores del TGF- β , indicando que el factor es necesario

para la mineralización y sugiriendo que la falta de betaglicano aminora la intensidad de la señal del TGF- β (38). Concordante con esta hipótesis, se demostró que en los cordocentros de los peces sin betaglicano hay una severa disminución de la fosforilación de Smad3, en especial en los puntos donde se observa los depósitos minerales. Hasta donde es de nuestro conocimiento, estas observaciones constituyen el primer ejemplo *in vivo* de la bien conocida función de presentación del ligando del betaglicano.

Conclusiones

Quizás la más importante conclusión de esta revisión es que el betaglicano es un pez escurridizo, que aún no hemos atrapado cabalmente, es decir, no podemos responder a la pregunta sobre la “verdadera” función *in vivo*, la relevancia biológica, de este co-receptor. Es justificado argumentar que, dada su florida estructura modular, no tenga una única “verdadera” función sino muchas y que ninguna sea tan determinante como lo es mutar una lisina en el sitio activo de una cinasa de proteínas. El betaglicano parece participar en muchos “debates fisiológicos” sin jamás emitir la “última palabra”. El hecho es que la evolución ha dotado (solamente) a los vertebrados con este co-receptor, es decir el TGFBR3 es una novedad que aparece en los genomas de los vertebrados, para un “propósito” que escapa de nuestra muy obcecada mentalidad determinista. Al fin y al cabo, la vida carece de propósito y parafraseando a Monod, tan solo es el resultado del azar y la necesidad.

Agradecimientos

El trabajo en nuestro laboratorio es financiado por donativos de Conacyt (254046) y de PAPIIT-UNAM (IN204916, IN204620). Molina-Villa, T., Ramírez-Vidal, L., Morales, E., han recibido becas de posgrado de Conacyt.

Referencias

1. Massagué J. The Transforming Growth Factor- β family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:597-641.
2. Laiho M, Weis FMB, Massague J. Concomitant Loss of Transforming Growth Factor (TGF)- β Receptor Types I and II in TGF- β -resistant Cell Mutants Implicates Both Receptor Types in Signal Transduction. *The Journal of Biological Chemistry.* 1990;265(30):18518-18524.
3. Massague J. TGF β signalling in context. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology.* 2012;13:617-630. <https://doi.org/doi:10.1038/nrm3434>.
4. Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell.* Nov 15 1991;67(4):785-95. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90073-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90073-8).
5. Cheifetz S, Andres JL, Massagué J. The Transforming Growth Factor- β receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *Journal of Biological Chemistry.* 1988;263(32):16984-16991.
6. Andres JL, Stanley K, Cheifetz S, Massagué J. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J Cell Biol.* 1989;109(6):3137-3145.
7. López-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massague J. Betaglycan Can

- Act as a Dual Modulator of TGF- β Access to Signaling Receptors: Mapping of Ligand Binding and GAG Attachment Sites. *The Journal of Cell Biology*. 1994;124(4):557-568.
8. López-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan Presents Ligand to the TGF β Signaling Receptor. *Cell*. 1993;73:1435-1444.
 9. Mendoza V, Vilchis-Landeros MM, Mendoza-Hernández G, et al. Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF- β binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry*. 2009;48:11755-11765.
 10. Villarreal MM, Kim SK, Barron L, et al. Binding Properties of the Transforming Growth Factor- β Coreceptor Betaglycan: Proposed Mechanism for Potentiation of Receptor Complex Assembly and Signaling. *Biochemistry*. 2016;55:6880-6896. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00566>.
 11. Kim SK, Henen MA, Hinck AP. Structural biology of betaglycan and endoglin, membrane-bound co-receptors of the TGF-beta family. *Experimental Biology and Medicine*. 2019;244(17):1547-1558. <https://doi.org/10.1177/1535370219881160>.
 12. Esparza-Lopez J, Montiel JL, Vilchis-Landeros MM, Okadome T, Miyazono K, Lopez-Casillas F. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem*. May 4 2001;276(18):14588-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008866200>.
 13. Kim SK, Henen MA, Hinck AP. Structural biology of betaglycan and endoglin, membrane-bound co-receptors of the TGF-beta family. *Experimental Biology and Medicine*. 2019;244(17):1547-1558. <https://doi.org/10.1177/1535370219881160>.
 14. Lewis KA, Gray PC, Blount AL, et al. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*. 2000;404:411-414.
 15. Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernández G, López-Casillas F. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- β neutralizing agent. *Biochem J*. 2001;355:215-222.
 16. Velasco-Loyden G, Arribas J, Lopez-Casillas F. The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J Biol Chem*. Feb 27 2004;279(9):7721-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306499200>.
 17. Lopez-Casillas F, Vilchis-Landeros MM, Esparza-López J, et al. Regulation of the Transforming Growth Factor- β Superfamily by Betaglycan. In: Jakowlew SB, ed. *Transforming Growth Factor- β in Cancer Therapy*. Vol I. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press; 2008:451-462.
 18. Bandyopadhyay A, Wang L, Lopez-Casillas F, Mendoza V, Yeh IT, Sun L. Systemic administration of a soluble betaglycan suppresses tumor growth, angiogenesis, and matrix metalloproteinase-9 expression in a human xenograft model of prostate cancer. *Prostate*. Apr 1 2005;63(1):81-90. <https://doi.org/10.1002/pros.20166>.
 19. Hernandez-Pando R, Orozco-Esteves H, Maldonado HA, et al. A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. May 2006;144(2):264-72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03049.x>.
 20. Juarez P, Vilchis-Landeros MM, Ponce-Coria J, et al. Soluble betaglycan reduces renal damage progression in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jan 2007;292(1):F321-9. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00264.2006>.
 21. Shute J. Glycosaminoglycan and chemokine/growth factor interactions. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(207):307-24. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23056-1_13.
 22. Andres JL, DeFalcis D, Noda M, Massagué Y. Binding of two growth factor families to separated domains of the proteoglycan betaglycan. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(9):5727-5930.
 23. Kim S, Whitley M, Krzysiak T, et al. Structural Adaptation in Its Orphan Domain Engenders Betaglycan with an Alternate Mode of Growth Factor Binding Relative to Endoglin. *Structure*. 2019;27:1-16. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.06.010>.
 24. Sugden WW, Meissner R, Aegerter-Wilmsen T, et al. Endoglin controls blood vessel diameter through endothelial cell shape changes in response to haemodynamic cues. *Nat Cell Biol*. Jun 2017;19(6):653-665. <https://doi.org/10.1038/ncb3528>.
 25. Chen W, Kirkbride KC, How T, et al. β -Arrestin 2 Mediates Endocytosis of Type III TGF- β Receptor and Down-Regulation of Its Signaling. *Science*. 2003;301:1394-1397.
 26. Dai X, Hua D, Lu X. Roles of TGF- β in cancer hallmarks and emerging onco-therapeutic design. *Expert Rev Mol Med*. Nov 8 2022;24:e42. <https://doi.org/10.1017/erm.2022.37>.
 27. Bilandzic M, Stenvers KL. Betaglycan: a multifunctional accessory. *Molecular Cellular Endocrinology*. 2011;339:180-189. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.014>.
 28. Compton LA, Potash DR, Brown CB, Barnett JV. Coronary vessel development is dependent on the type III Transforming Growth Factor β Receptor. *Circulation Research*. 2007;101:784-791.
 29. Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, et al. Heart and Liver Defects and Reduced Transforming Growth Factor 2 Sensitivity in Transforming Growth Factor Type III Receptor-Deficient Embryos. *Molecular and Cellular Biology*. 2003;23(12):4371-4385.
 30. Lopez-Casillas F, Riquelme C, Perez-Kato Y, et al. Betaglycan expression is transcriptionally up-regulated during skeletal muscle differentiation. Cloning of murine betaglycan gene promoter and its modulation by MyoD, retinoic acid, and transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. Jan 3 2003;278(1):382-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208520200>.
 31. Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV. Requirement of Type III TGF- β Receptor for Endocardial Cell Transformation in the Heart. *Science*. 1999;283:2080-2082.
 32. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFb knockout phenotypes. *Development*. Jul 1997;124(13):2659-70. <https://doi.org/10.1242/dev.124.13.2659>.
 33. Brûlé E, Wang Y, Li Y, et al. TGFBR3L is an inhibin B co-receptor that regulates female fertility. *Science Advances*. 2021;7(51):eabl4391. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abl4391>.
 34. Kamaid A, Molina-Villa T, Mendoza V, et al. Betaglycan knock-down causes embryonic angiogenesis defects in zebrafish. *Genesis*. 2015;53:583-603. <https://doi.org/10.1002/dvg.22876>.
 35. Ramirez-Vidal L, Molina-Villa T, Mendoza V, Dobromir D, Lopez-Casillas F. Betaglycan promoter activity is regulated during zebrafish development of the tail somitic myogenesis. . Submitted. 2023.
 36. Morcos PA. Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with morpholino oligos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;358:521-527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.172>.
 37. Pece-Barbara N, Vera S, Kathirkamathamby K, et al. Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. *J Biol Chem*. Jul 29 2005;280(30):27800-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503471200>.
 38. Molina-Villa T, Ramirez-Vidal L, Mendoza V, Escalante-Alcalde D, López-Casillas F. Chordacentrum mineralization is delayed in zebrafish betaglycan-null mutants. *Dev Dyn*. Jan 2022;251(1):213-225. <https://doi.org/10.1002/dvdy.393>.
 39. Kok F, Shin M, Ni C-W, et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Developmental Cell*. 2015;32:97-108.
 40. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015;524:230-233.
 41. El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLOS Genetics*. 2017;13(7):e1006780. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006780>.



DR. FERNANDO LÓPEZ CASILLAS
ORCID: 0000-0002-3689-1824

El Dr. López Casillas egresó de la carrera de Médico Cirujano (Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México) en 1980 y obtuvo el grado de Doctor en Bioquímica (Doctor of Philosophy, Ph.D.) en 1988 en la Universidad de Purdue en West Lafayette, Indiana, EUA. Entre 1990 y 1994 realizó trabajo Posdoctoral en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York, NY, EUA. En 1995 se incorporó al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde actualmente es Investigador Titular C de Tiempo Completo.

En el curso de su carrera como investigador ha hecho contribuciones seminales en dos temas principales, la Acetil Coenzima A Carboxilasa (ACC), la enzima que regula la síntesis de ácidos grasos y el Receptor tipo 3 del TGF- β (TGFB3) también conocido como Betaglicano. Su trabajo ha contribuido a sentar las bases de un paradigma funcional para los co-receptores de citocinas y factores de crecimiento celular, en particular en el campo del TGFB3, donde es reconocido como un líder internacional y le han hecho merecedor de diversas distinciones.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 128-152

Memoria del 50° Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

De constantes cinéticas, control metabólico y biología de sistemas.

On kinetic constants, metabolic control and systems biology.

Pardo Vázquez, Juan Pablo^{1*}; Romero Aguilar, Lucero¹; Rendón Gómez, Juan Luis¹; Flores Herrera, Oscar¹ y Guerra Sánchez, María Guadalupe².

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

²Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

*Correspondencia: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CDMX (México), C.P. 04510, Mexico. Tel. (+52)555623-42168, pardov@bq.unam.mx.

Resumen

Para la caracterización de una enzima desde un punto de vista cinético, la obtención de parámetros como la K_m , la k_{cat} y el cociente k_{cat}/K_m es importante. Con respecto a los dos primeros, su definición es clara. La K_m corresponde a la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima y la k_{cat} describe los moles de sustrato que se transforman en producto por unidad de tiempo y por mol de enzima o mol de sitios activos. La k_{cat}/K_m se ha definido de dos maneras, como constante de especificidad y como eficiencia catalítica. Sin embargo, esta última definición es imprecisa. Una nueva interpretación explica que k_{cat}/K_m corresponde a la constante de velocidad de la captación del sustrato por una enzima para formar uno o varios complejos productivos. Así como se caracteriza una enzima y se obtienen sus parámetros cinéticos, con el estudio cuantitativo de una vía metabólica, que forma parte del análisis del control metabólico, se obtiene el grado en el que cada enzima controla el flujo de la vía y esto se realiza a través de los coeficientes de control de flujo, de las elasticidades y de las relaciones que existen entre estos. Con el fin de explicar los cambios en el flujo de la vía por metabolitos externos, se definieron los coeficientes de respuesta. Por último, el metabolismo intermedio está

Abstract

For the characterization of an enzyme, it is important to obtain the kinetic parameter, K_m , k_{cat} and the k_{cat}/K_m ratio. Regarding the first two, their definition is clear. The K_m corresponds to the concentration of substrate concentration at which half of the maximum speed is reached and the k_{cat} describes the moles of substrate that are transformed into product per unit of time and per mole of enzyme. The k_{cat}/K_m has been defined in two ways, as the specificity constant and as the catalytic efficiency. However, this last definition is imprecise. A new interpretation explains that the k_{cat}/K_m corresponds to the rate constant of the capture of the substrate by an enzyme to form one or several productive complexes. Just as it is important to obtain the kinetic parameters of an enzyme, it is also important to study quantitatively a metabolic pathway, giving numbers to the degree each enzyme controls the flow of the pathway, and this is done through the metabolic control analysis, which includes terms as flow control coefficients, elasticities, and the relationships between these two coefficients. In order to explain changes in pathway flux by external metabolites, response coefficients were defined. Finally, intermediate metabolism is made up of a large number of metabolic pathways with an even larger number of

formado por una gran cantidad de vías metabólicas con un número de todavía mayor de enzimas e intermediarios. Para analizar la respuesta de una célula a condiciones ambientales, por ejemplo, glucosa, se utiliza una matriz estequiométrica que contiene todas las reacciones que se llevan a cabo en los diferentes compartimentos celulares, un vector de velocidades y se resuelve este sistema maximizando un parámetro, por ejemplo la producción de biomasa.

Palabras clave: cinética enzimática, eficiencia catalítica, análisis de control metabólico, biología de sistemas, análisis de balance de flujos.

enzymes and intermediaries. To analyze the response of a cell to different environmental conditions, for example glucose, a stoichiometric matrix containing all the reactions carried out in the different cellular compartments, a rate vector, and this system is solved by maximizing a parameter, for example, the production of biomass.

Key words: enzyme kinetics, catalytic efficiency, metabolic control analysis, systems biology, flux balance analysis.

Objetivos

Los objetivos de esta revisión son varios. En primer lugar, dar una interpretación novedosa de la relación k_{cat}/K_m , uno de los parámetros cinéticos de la ecuación de la doble recíproca, revisar la teoría del análisis del control metabólico y de la biología de sistemas, principalmente en la parte de la obtención de un modelo metabólico a partir de un genoma y su comprobación por medio de análisis de balance de flujos. En segundo lugar, y desde un punto de vista de la aplicación de la teoría, introducir tres programas gratuitos que se utilizan para deducir ecuaciones de velocidad de modelos cinéticos, para construir vías metabólicas y analizar su comportamiento, y para construir modelos metabólicos a partir del genoma de un organismo.

Fechas importantes en la enzimología

Pasaron muchos años antes de saber que cierto tipo de estructuras, que hoy conocemos como proteínas y que llamamos enzimas, eran las que catalizaban las reacciones dentro y fuera de la célula, por ejemplo, en la sangre de los vertebrados. La figura 1 muestra una cronología de algunos de los avances teóricos y experimentales más importantes en el campo de la enzimología (1).

La primera enzima que se descubrió fue la diastasa (1), que realmente era una mezcla de enzimas que degradaban el almidón en maltosa. Esto fue en el año de 1833. En 1836 Berzelius propuso que estas entidades, cuya naturaleza se desconocía, eran los catalizadores que aceleraban la

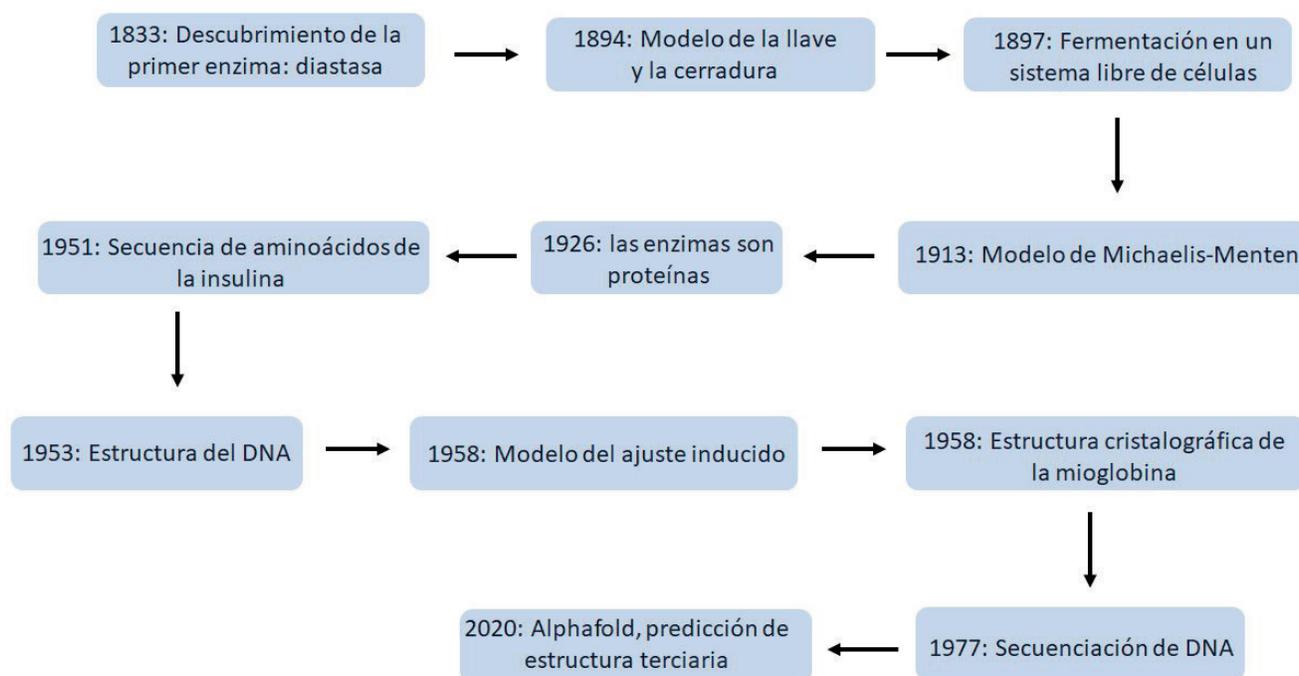


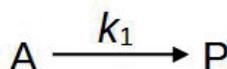
Figura 1. Eventos importantes en el campo de la investigación de las enzimas (modificado de (1)).

velocidad de las reacciones en la célula. Fue en 1877 que Wilhelm Kuhne introdujo el término de enzima para estas moléculas que funcionaban como catalizadores, aunque se desconocía su naturaleza química (1). Otro avance importante fue la demostración, en 1897, de que la transformación de la glucosa en etanol se podía llevar a cabo con un extracto de levaduras, sin la participación de las células íntegras (2,3). Este experimento, realizado por Eduard Buchner, fue el golpe final al vitalismo, que abogaba por una fuerza vital necesaria para que se produjeran las transformaciones complejas propias de las células (glucosa a etanol), y que solamente los procesos sencillos, como las reacciones de hidrólisis, catalizadas por las diastasas y proteasas, se debían a las enzimas. En 1894, Emil Fischer propone el modelo de la llave y la cerradura para explicar la especificidad de las enzimas (4,5), y en 1926 James B. Sumner cristaliza la primera enzima, la ureasa (6), y confirma que es una proteína, por lo que finalmente se llega a la conclusión de que las enzimas son proteínas. Veinticinco años después, Sanger reporta la secuencia de aminoácidos de la insulina (7). Regresando un poco en el tiempo, en 1913 Leonor Michaelis y Maud Menten proponen su modelo de cinética enzimática que incluye la interacción de la enzima con su sustrato y la definición de dos parámetros cinéticos, la constante de Michaelis (K_m) y la constante catalítica (k_{cat}), que se incluye en la velocidad máxima (V_{max}) (8). En 1958 Koshland describe el modelo del ajuste inducido (9) y John Kendrew reporta la estructura de la mioglobina por medio de la cristalografía de rayos X (10). El mismo Sanger, en 1977, publica el método para la secuenciación del DNA (11) y, junto con la publicación de la técnica de PCR (por sus siglas en inglés, Polimerase Chain Reaction) en 1984 por Kary Mullins (12-14), se dispara el número de secuencias de aminoácidos de proteínas a partir de los genes y genomas secuenciados; esta información se recopila, para un gran número de proteínas y de especies, en la base de datos UniProtKB (<https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot>). Por último, y dejando de lado un gran número de descubrimientos, en 2020 se pone al servicio del público AlphaFold2, un programa de inteligencia artificial desarrollado por DeepMind, para predecir el plegamiento de las proteínas con un alto grado de certeza (15).

Cinética química

Para analizar las diferentes regiones de la curva de Michaelis-Menten, es importante conocer las reacciones de primer y segundo orden, así como las unidades de las constantes de velocidad asociadas a cada una de éstas (4,5,16).

En una reacción de primer orden como



la dependencia de la velocidad de la reacción en función de la concentración de A se describe por la siguiente ecuación:

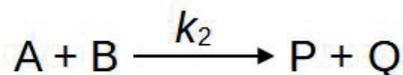
$$v = k_1[A] = k_1[A]^1 \quad 1$$

en donde v , la velocidad de la reacción, se define como la variación del reactante o del producto con respecto al tiempo

$$v = -dA/dt = dP/dt \quad 2$$

y k_1 , la constante de velocidad de primer orden tiene las unidades de tiempo⁻¹ (s⁻¹, min⁻¹, h⁻¹). De acuerdo con la primera ecuación, la velocidad es una función lineal de la concentración de A. La reacción es de primer orden debido a que el exponente asociado a la concentración de A es 1. Desde un punto de vista práctico, k_1 informa de la proporción de moléculas de A que se transforman por unidad de tiempo (4). Por ejemplo, con una k_1 de 0.06 min⁻¹, el 6% de las moléculas de A se transforman en producto en un minuto. Este resultado es independiente de la concentración de A.

El siguiente esquema describe una reacción de segundo



orden:

En este caso, para que ocurra la formación de productos, debe haber colisiones entre las moléculas de A y B, con la energía y orientación adecuadas.

La ecuación de velocidad asociada a esta reacción es:

$$v = k_2[A][B] = k_2[A]^1[B]^1 \quad 3$$

El orden de la reacción con respecto a A es de 1, con respecto a B también es de 1 y el orden global de la reacción es de dos. Las unidades de k_2 , la constante de velocidad de segundo orden, son M⁻¹s⁻¹. Por tanto, el conocimiento de las unidades de las constantes de velocidad nos permite identificar el tipo de reacción.

Cuando la velocidad es independiente de la concentración del reactante, se obtiene una reacción de orden cero:

$$v = k = k[A]^0 \quad 4$$

Esta cinética es característica de reacciones catalizadas por una enzima en la región de concentraciones de sustrato muy grandes.

Cinética enzimática: la ecuación de Michaelis-Menten

Como se mencionó anteriormente, en 1913 Michaelis y Menten desarrollaron un modelo para explicar la actividad de una enzima (8). Su objetivo era demostrar que la velocidad

de una reacción catalizada por una enzima era proporcional a la concentración del complejo enzima-sustrato. A partir del siguiente esquema:



en donde E corresponde a la enzima libre, S al sustrato libre y ES al complejo enzima-sustrato, se obtiene la famosa

ecuación de Michaelis-Menten (M-M), que relaciona la velocidad de la reacción con la concentración del sustrato a través de dos parámetros, K_m y V_{max} (o k_{cat}):

$$v = k_{cat}[E_0][S]/(K_m + [S]) = V_{max}[S]/(K_m + [S]) \quad 5$$

La figura 2 muestra la gráfica de la ecuación de M-M.

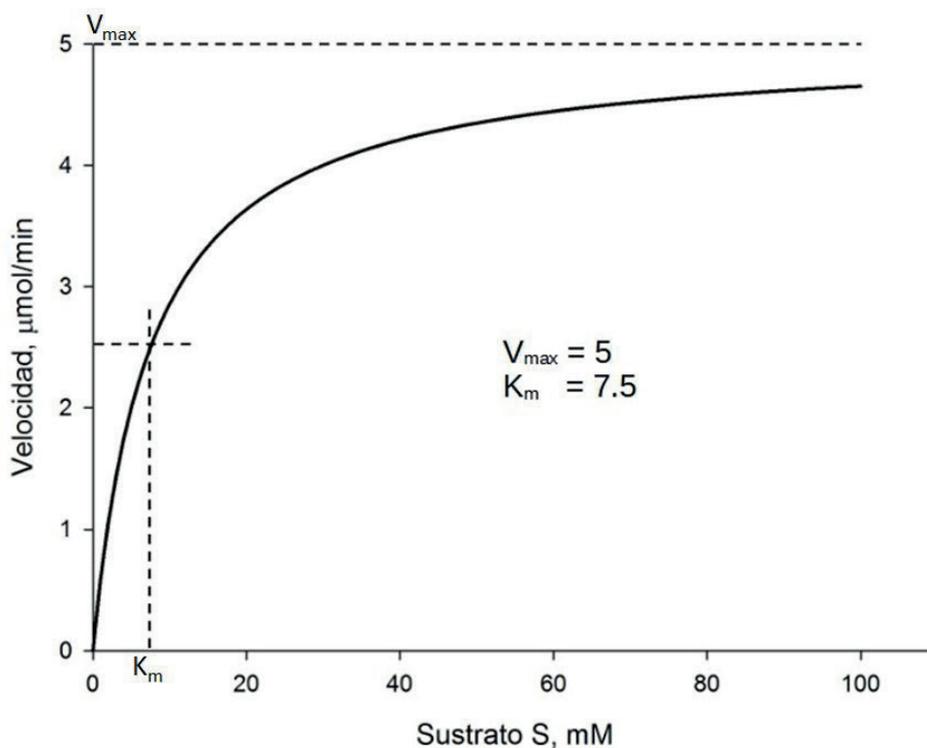


Figura 2. Cinética de Michaelis-Menten. Se grafica la velocidad de la reacción en función de la concentración de sustrato.

En la gráfica se indica, con una línea punteada, la asíntota horizontal que se alcanza a concentraciones infinitas de sustrato y que corresponde al valor de la velocidad máxima (V_{max}), y en las abscisas, la K_m , la concentración de sustrato a la cual se obtiene una velocidad igual a $0.5 \cdot V_{max}$. Es importante notar que inclusive con una concentración de sustrato 13 veces mayor que la K_m ($100/7.5$), el sistema no alcanza la V_{max} .

A concentraciones muy pequeñas de sustrato, la ecuación de M-M se reduce a

$$v = k_{cat}[E_0][S]/K_m = V_{max}[S]/K_m \quad 6$$

En el primer caso, que incluye explícitamente a la enzima total, las unidades del cociente k_{cat}/K_m son $M^{-1}s^{-1}$ (constante de segundo orden) y, para V_{max}/K_m , son de s^{-1} (constante de primer orden). Aunque más adelante se va a profundizar en la interpretación de este cociente, basta decir por ahora que

en el primer caso se refiere a una constante de segundo orden que describe la interacción de E con S para formar P, mientras que en el segundo, en el que la concentración de la enzima se incluye en el término de V_{max} , el cociente V_{max}/K_m se refiere a una reacción de primer orden para la transformación de S en P.

Al parámetro k_{cat}/K_m se le ha llamado eficiencia catalítica (5,17), ya que es una medida de la eficiencia con la que una enzima transforma los sustratos en productos. Mientras más grande sea este valor, mayor es la eficiencia catalítica. De acuerdo con la teoría de las colisiones moleculares, la constante de velocidad de segundo orden de un proceso bimolecular está entre 10^8 - $10^9 M^{-1}s^{-1}$. Por tanto, para ciertas enzimas, como la anhidrasa carbónica (18), la fumarasa (19) y la triosa fosfato isomerasa (20), con valores de k_{cat}/K_m cercanos al límite superior teórico, la catálisis está limitada por la difusión del sustrato al sitio activo y se menciona que

estas enzimas alcanzaron la perfección catalítica (5,17,21) (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de algunas enzimas.

Enzima	K_m (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Quimotripsina	1.5×10^{-2}	0.14	9.3
Ribonucleasa	7.9×10^{-3}	7.9×10^2	1.0×10^5
Anhidrasa carbónica	1.0×10^{-3}	1.3×10^5	3.6×10^7
Fumarasa	4.6×10^{-4}	1.9×10^3	4.2×10^6
TriosaP isomerasa	4.7×10^{-4}	2.6×10^5	5.5×10^8

A la k_{cat}/K_m también se le llama constante de especificidad (17), porque mide la preferencia de una enzima por varios sustratos. Por ejemplo, la hexocinasa 1 puede tomar a los siguientes monosacáridos: D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, sorbitol y D-glucosamina, y en lugar del ATP puede aceptar al ITP y al dATP (<https://www.brenda-enzymes.org/index.php>, <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC2/7/1/1.html>). La hexocinasa 1 prefiere a la D-glucosa y al ATP sobre los otros sustratos. Mientras más grande sea el valor de la constante de especificidad, mayor es la preferencia de la enzima por ese sustrato.

A concentraciones infinitas de sustrato, la ecuación de M-M se simplifica a

$$v = k_{cat}[E_0] = V_{max} \quad 7$$

Es decir, la velocidad es constante e independiente de la concentración de sustrato, y por tanto, el sistema se encuentra en el régimen de orden cero ($[S]^0$). La k_{cat} tiene unidades de s^{-1} , y describe los moles de sustrato que se convierten en producto por unidad de tiempo por mol de enzima o mol de sitios activos. Otro nombre que se le da a la k_{cat} es número de recambio (5).

Por último, la K_m corresponde a la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la V_{max} (4,5,16). En ocasiones, la K_m es igual a la constante de disociación del complejo ES (K_s), y en esta condición se puede hablar de que la K_m mide la afinidad de la enzima por su sustrato (4,17). Cuando la K_m es igual a la K_s , hay una relación inversa entre la K_m y la afinidad de la enzima. Mientras mayor es la K_m , menor es la afinidad de la enzima por su sustrato y viceversa. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la K_m no es igual a la K_s . En este caso, la K_m no se puede relacionar con la afinidad de la enzima. Por ejemplo, se puede dar el caso de que una mutación afecte

la K_m pero no la K_s . De hecho, para un buen número de reacciones con varios sustratos, la $K_m < K_s$. Cabe señalar que la K_m se deriva de dos parámetros fundamentales, es decir, la K_m se obtiene a partir del cociente de dos constantes de velocidad, V_{max} y (V_{max}/K_m) o k_{cat} y (k_{cat}/K_m).

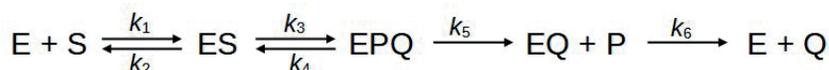
Programa para deducir ecuaciones de velocidades

Como en cualquier campo de la investigación, la teoría y la práctica son importantes. La teoría coloca los cimientos y la práctica se desarrolla sobre esas bases. Lo mismo se puede decir de la cinética enzimática. Primero, hay que saber deducir la ecuación de velocidad de cualquier modelo, por muy complicado que éste sea. En segundo lugar, hay que arreglar la ecuación para que quede en forma de parámetros cinéticos. Finalmente, hay que analizar e interpretar la ecuación.

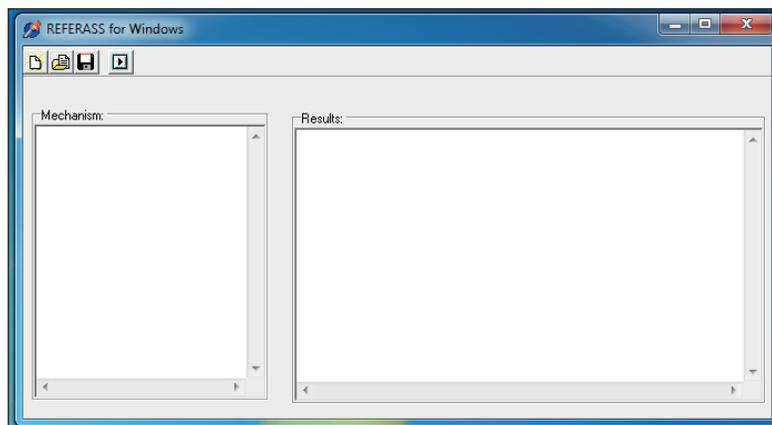
El grado de dificultad para deducir la ecuación de velocidad depende de la complejidad del modelo. Por ejemplo, en la condición de estado estacionario, para los mecanismos BiBi al azar, la ecuación que se obtiene tiene términos cuadráticos en la concentración de A y B. Sin embargo, si se supone equilibrio rápido, desaparecen los términos cuadráticos y la ecuación se simplifica.

Aunque la deducción de la ecuación de velocidad para el mecanismo uni-uni irreversible ($S \rightarrow P$) es muy sencilla y se encuentra en casi todos los libros de Bioquímica (5,22,23), intentar la deducción de la ecuación de velocidad para mecanismos más complicados no es fácil. Y es en este punto que el uso de programas como **wREFERASS** (24,25) facilita el trabajo. Además, tiene la ventaja que se puede hacer la suposición de equilibrio rápido para ciertas etapas del mecanismo, lo que simplifica la ecuación.

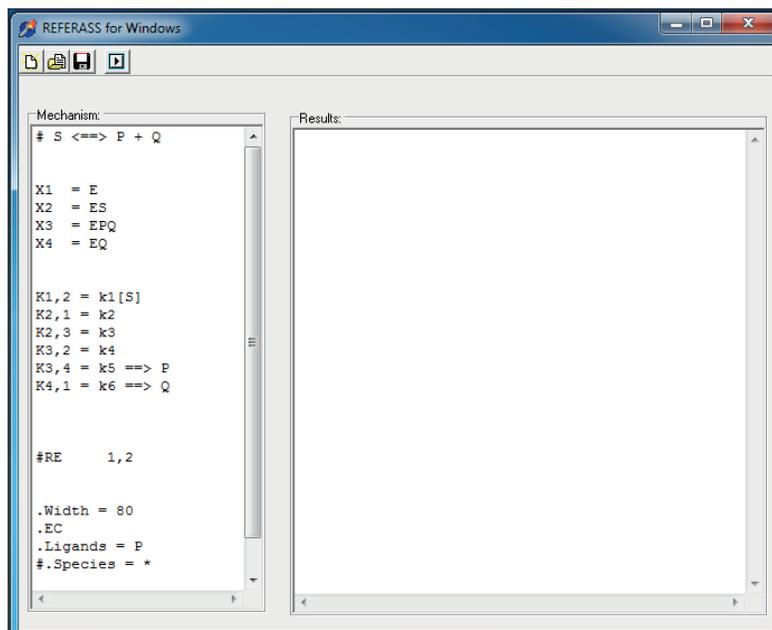
Para obtener la ecuación de velocidad del siguiente mecanismo (que se utilizará más adelante):



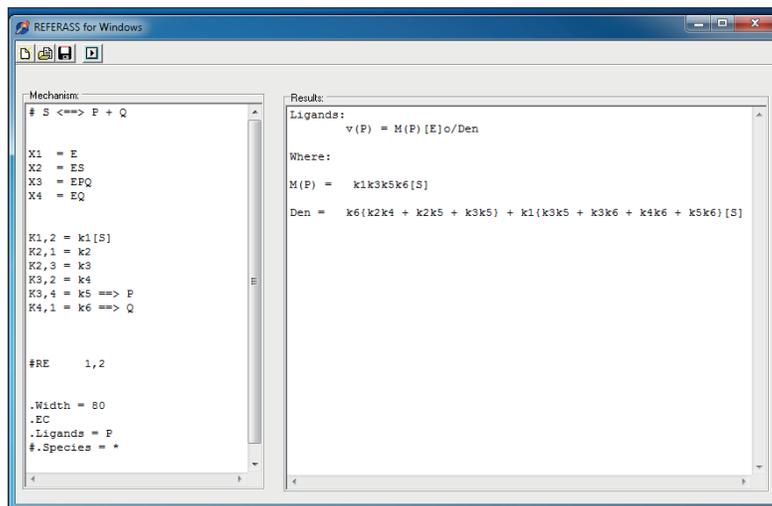
Se ejecuta wREFERASS y se obtiene la siguiente ventana, con dos secciones, la del Mecanismo y la de Resultados:



Luego se llama al mecanismo que se debe encontrar en un archivo tipo texto. La información contenida en este archivo se muestra en la ventana de Mecanismo. La presencia del símbolo gato indica que ese renglón es un comentario que no se toma en cuenta durante el cómputo. En este ejemplo, informa de la reacción que se estudia:



Por último, se corre el programa (ícono play) y se obtiene la ecuación de velocidad en términos de constantes de velocidad (k_1 , k_2 , etc), en donde M(P) es la expresión del numerador de la ecuación de M-M y Den corresponde al denominador:



A partir de este punto, en forma manual y con base en la nomenclatura de Cleland (12 BBA), se arregla la ecuación de velocidad en términos de los parámetros cinéticos, K_m y V_{max} :

$$M(P) = k_1 k_3 k_5 k_6 [S]$$

$$\text{Den} = k_6 \{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5\} + k_1 \{k_3 k_5 + k_3 k_6 + k_4 k_6 + k_5 k_6\} [S]$$

$$v = M(P)/\text{Den} = k_{cat} * E_0 * [S] / (K_m + [S])$$

en donde

$$k_{cat} = k_3 k_5 k_6 / \{k_3 k_5 + k_3 k_6 + k_4 k_6 + k_5 k_6\} \quad 8$$

$$K_m = k_6 \{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5\} / k_1 \{k_3 k_5 + k_3 k_6 + k_4 k_6 + k_5 k_6\} \quad 9$$

De estas dos ecuaciones se obtiene

$$k_{cat}/K_m = k_1 k_3 k_5 / \{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5\} \quad 10$$

La ecuación de Lineweaver-Burk

Desde un punto de vista experimental, no se pueden usar concentraciones infinitas de sustrato ya que las enzimas pueden inhibirse por el o los sustratos, o la solubilidad de estos puede ser muy limitada. Y puesto que la V_{max} en la ecuación de M-M se alcanza a concentraciones infinitas de sustrato (ver Figura 2), el valor de este parámetro no se puede obtener de la gráfica de velocidad contra la concentración de sustrato, v vs $[S]$. Asimismo, la K_m tampoco se puede calcular, ya que se obtiene a partir del valor de la V_{max} . Por tanto, hay que buscar un método para extrapolar la concentración de S hasta infinito y la función más apropiada para realizar extrapolaciones es la línea recta. Sacando el recíproco de ambos miembros de la ecuación de M-M se obtiene la ecuación de Lineweaver-Burk (L-B), también conocida como la doble recíproca (5,22,26):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad 11$$

Puesto que $V_{max} = k_{cat} E_0$, se puede factorizar la concentración de enzima y pasarla al otro lado del signo de igual, con lo que se obtiene la ecuación de la doble recíproca en términos de k_{cat} :

$$\frac{E_0}{v} = \frac{K_m}{k_{cat}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_{cat}} \quad 12$$

La ecuación 12 y la figura 3 muestran que la ecuación de la doble recíproca es una recta con pendiente K_m/k_{cat} y ordenada al origen $1/k_{cat}$.

Todos los valores en el eje de las ordenadas, que cruza al eje de las abscisas ($1/[S]$) en el cero, corresponden a una concentración de sustrato infinita ($1/\text{infinito} = 0$). Por tanto, es a partir del intercepto de la recta con el eje de las ordenadas (eje Y) que se obtiene la k_{cat} (V_{max}) en forma de recíproco ($1/k_{cat}$ o $1/V_{max}$). Asimismo, a partir del intercepto de la recta con el eje de las abscisas (eje X) se obtiene el recíproco de la K_m ($-1/K_m$). Hay que mencionar que la pendiente de la

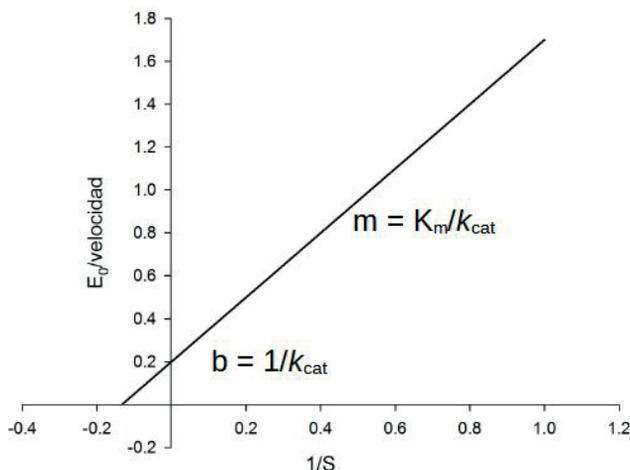


Figura 3. Gráfica de Lineweaver-Burk o de la doble recíproca. Existe una relación lineal entre el recíproco de la velocidad y el recíproco de la concentración de sustrato.

recta de la doble recíproca es el recíproco de la constante de velocidad de segundo orden que se obtiene a concentraciones bajas de sustrato (k_{cat}/K_m) y que la ordenada al origen es el recíproco de la constante de velocidad de primer orden (k_{cat}) que se obtiene a concentraciones infinitas de sustrato.

Una nueva interpretación de k_{cat}/K_m

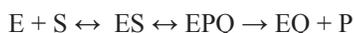
En esta parte del presente trabajo se sigue de cerca el enfoque de Northrop (27). Dicho autor resalta que la ecuación de M-M, siendo una ecuación de velocidad, tenga un parámetro con unidades de concentración, la K_m . Es decir, en el mundo de Michaelis-Menten, la cinética enzimática se dividió en dos dominios, el de la catálisis (k_{cat}) y el de la unión del sustrato (K_m). En contraste, en la ecuación de la doble recíproca, los dos parámetros corresponden a constantes de velocidad, ya que la pendiente es el recíproco de la k_{cat}/K_m (unidades de $k_{cat}/K_m = M^{-1}s^{-1}$), mientras que la ordenada al origen es el recíproco de la k_{cat} (unidades de $k_{cat} = s^{-1}$).

Por otro lado, las interpretaciones de V_{max}/K_m o k_{cat}/K_m que se mencionaron anteriormente incluyen la formación de los

productos, es decir, que se supone que se completa un ciclo catalítico. Sin embargo, al analizar la ecuación de la k_{cat}/K_m que obtuvimos para el siguiente mecanismo de reacción:



el valor de la k_{cat}/K_m está determinado por las constantes de velocidad de las etapas que van de la enzima libre E hasta el primer paso irreversible (señaladas en amarillo), es decir, no aparece la k_6 :



y la k_{cat} está definida por los pasos que van del complejo enzima-sustrato ES hasta la liberación de la enzima libre (en amarillo) y de los productos, es decir, no aparecen las constantes k_1 y k_2 :



Puesto que la K_m es el cociente de estos parámetros fundamentales, queda determinada por el mecanismo completo (aparecen todas las constantes de velocidad):



Por tanto, si la k_{cat}/K_m no mide la velocidad con la que se completa el ciclo catalítico, que incluye la liberación de todos los **productos**, entonces ¿qué mide?

Para contestar esta pregunta, Northrop utilizó la ecuación de L-B (26), que separa los parámetros fundamentales, k_{cat}/K_m y k_{cat} , pero modificada por Dalziel (28), en donde en forma explícita se toma en cuenta la concentración de enzima:

$$\frac{E_0}{V} = \frac{\varphi_1}{[S]} + \varphi_0 \quad 13$$

en donde φ_1 es igual a K_m/k_{cat} y φ_0 es igual a $1/k_{\text{cat}}$.

Mientras que la ecuación de L-B tiene explícitamente el recíproco de constantes de velocidad, la de Dalziel se expresa en forma de constantes de tiempo. La ecuación de Dalziel establece que el tiempo necesario para que una reacción enzimática se lleve a cabo es igual a la suma del tiempo que le toma a la enzima y al sustrato unirse para formar el/los complejos productivos, (φ_1/S) , más el tiempo que le toma a este complejo generar el/los producto(s) y liberarlos, φ_0 (29). A diferencia de las constantes de velocidad, las constantes de tiempo se pueden sumar (29).

Al comparar las ecuaciones de L-B y de Dalziel, se observa que φ_1 es el recíproco de la k_{cat}/K_m , y de aquí se puede deducir que k_{cat}/K_m es la constante de velocidad para la formación del complejo productivo de la enzima con el sustrato, en donde el complejo productivo incluye múltiples complejos en mecanismos con muchos pasos, por ejemplo, ES y EPQ en

el esquema de arriba (29). De esta manera, Northrop propone el término de captura para la formación de los complejos productivos y lo simboliza como k_{cap} (29). Entonces, k_{cat}/K_m corresponde a la velocidad de captura del sustrato por la enzima para formar el complejo productivo, mientras que la k_{cat} es una medida de la velocidad de la liberación (release) de la enzima libre y el/los productos a partir del complejo productivo, por lo que sugiere llamarle k_{rel} (29). Una ventaja de esta terminología es que la unión del sustrato en el modelo de M-M es un concepto estático (se asocia muchas veces a una constante de equilibrio), mientras que la captura es un concepto cinético, y que la k_{cat} que intuitivamente se asigna a un solo paso, en el concepto de liberación se incluyen muchos pasos (29).

Un ejemplo cotidiano que podría servir para aclarar estos conceptos es el siguiente: El tiempo que le toma a una persona para llegar al aeropuerto y subir al avión correspondería a la captura (k_{cap}), mientras que el despegue del avión y la llegada a su destino final y la salida del pasajero estaría relacionado con la liberación (k_{rel}). Un inhibidor competitivo aumenta el tiempo de la captura, por ejemplo, el tráfico de la Ciudad de México en nuestro ejemplo, mientras que un inhibidor no competitivo aumenta el tiempo asociado a la liberación de la enzima y los productos, y aquí podríamos mencionar a la lluvia, la nieve o la saturación del aeropuerto de la CDMX, que retrasan el aterrizaje del avión (29).

Diagrama de energía libre para k_{cat}/K_m

A partir del esquema descrito por Northrop (29,30):



y utilizando el programa **wREFERASS** (24,25), se obtuvo:

$$k_{\text{cat}}/K_m = k_1 k_3 k_5 / \{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5\} \quad 10$$

Sin embargo, es difícil identificar la contribución de cada etapa del mecanismo cinético al valor de la k_{cat}/K_m . Para separar las contribuciones, el truco es obtener el recíproco de la k_{cat}/K_m (13)

$$1/(k_{\text{cat}}/K_m) = 1/(k_1 k_3 k_5 / k_2 k_4) + 1/(k_1 k_3 / k_2) + 1/k_1 \quad 14$$

Las unidades del denominador de cada uno de los términos son de $M^{-1}s^{-1}$. Si cada término se multiplica por la concentración de sustrato, entonces $M^{-1}s^{-1}$ se reduce a s^{-1} , que es la unidad de una constante de velocidad de primer orden. De acuerdo con esta ecuación, el valor más pequeño de $1/(k_1 k_3 k_5 / k_2 k_4)$, $1/(k_1 k_3 / k_2)$ o $1/k_1$ es el que va a tener la mayor influencia sobre la k_{cat}/K_m . Por ejemplo, si k_1 es mucho menor que el valor de los otros cocientes, entonces su recíproco es el que tiene el valor más alto, por lo que los otros dos términos se pueden despreciar y la k_{cat}/K_m sería igual a k_1 .

¿Cuál es el significado de esto? De acuerdo con Chiwook (30), para contestar esta pregunta se construyen los diagramas de energía libre para las primeras tres etapas del modelo cinético (que intervienen en la definición de k_{cat}/K_m) y se suponen tres situaciones, la primera, que el estado de transición para la asociación de la enzima con su sustrato ($E + S \rightarrow ES$) es el más alto; la segunda, cuando el estado de transición para la conversión química ($ES \rightarrow EP$) tiene el mayor valor, y la última cuando el estado de transición para la liberación del producto P tiene el valor más grande ($EPQ \rightarrow E + P$) (30) (Figura 4)

Las alturas de los estados de transición en la figura 4 se obtienen al multiplicar $(k_1 k_3 k_5 / k_2 k_4)$, $(k_1 k_3 / k_2)$ o k_1 por la concentración de sustrato (30). Cuando el estado de transición para la unión del sustrato ($E + S \rightarrow ES$) es el más alto (Figura 4A), el valor de k_{cat}/K_m está determinado principalmente por la cinética de la asociación del sustrato ($k_{cat}/K_m = k_1$) (15). En este caso, la reacción está controlada por la difusión del sustrato al sitio activo de la enzima y la k_{cat}/K_m puede alcanzar valores de 10^8 - 10^9 M⁻¹s⁻¹. Cuando el estado de transición para

la conversión química ($ES \rightarrow EP$) es la más alta (Figura 4B), la k_{cat}/K_m está determinada principalmente por $k_1 k_3 / k_2$ (15). Puesto que k_2 / k_1 es igual a la constante de disociación del complejo ES (K_s), la k_{cat}/K_m puede representarse como k_3 / K_s . En este caso, la k_{cat}/K_m es una medida de la capacidad catalítica (k_3) y de la afinidad por el sustrato (K_s). Además, en esta condición el sistema se encuentra en equilibrio rápido ($K_m = K_s$). En la última condición (Figura 4C), la k_{cat}/K_m está determinada por la etapa de la liberación del producto P ($EPQ \rightarrow P + EQ$) (30).

Si ahora se sigue el mismo procedimiento con la k_{cat} , se tiene:

$$k_{cat} = k_3 k_5 k_6 / (k_3 k_5 + k_3 k_6 + k_4 k_6 + k_2 k_6)$$

$$1/k_{cat} = 1/k_6 + 1/k_5 + (k_4)/(k_2 k_3) + 1/k_3 \tag{15}$$

De acuerdo con esta ecuación, el valor más pequeño de k_6 , k_5 o k_3 va a tener la mayor influencia sobre la k_{cat} . Por ejemplo, si k_6 es mucho menor que las otras 2, entonces la k_{cat} está limitada por la liberación de Q. Es decir, $k_{cat} = k_6$.

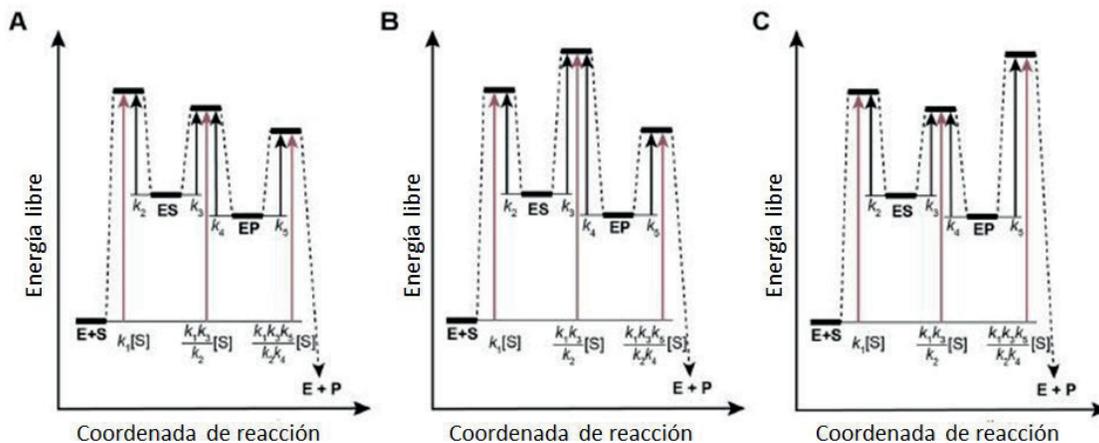


Figura 4. Diagrama de energía libre para las contribuciones de cada una de las etapas del mecanismo cinético a la k_{cat}/K_m (modificada de Chiwook (30)).

Análisis de Control Metabólico

Son varios los mecanismos que se utilizan para ajustar la actividad de una enzima a las demandas metabólicas de la célula (5,22,23). Ya sea que se aumente o disminuya la expresión de la enzima, o que su velocidad de degradación cambie, o que la actividad se module por activadores o inhibidores alostéricos o que la enzima se altere debido a una modificación química, como la fosforilación en residuos de serina, treonina o tirosina, el objetivo es ajustar la actividad de la enzima y de una vía metabólica a las necesidades de la célula (5,22,23). El desarrollo en la cinética enzimática ha sido impresionante desde el artículo de M-M. Por ejemplo, la base de datos “Brenda Enzyme Database” (<https://www.brenda-enzymes.org/>), contiene los valores de los parámetros cinéticos de muchas enzimas y, a través de las referencias, se obtienen las ecuaciones de velocidad de éstas.

Si ahora colocamos varias enzimas para formar una vía

metabólica, surgen algunas preguntas. Por ejemplo, ¿qué le ocurre al flujo de la vía cuando la actividad de una enzima se altera? ¿Se reparte el control del flujo entre las diferentes enzimas? ¿Qué ocurre con la concentración de un intermediario de la vía cuando cambia la actividad de una enzima? ¿Existe una sola etapa limitante en la vía? ¿Qué molécula (inhibidor o activador) tiene el mayor efecto en el flujo de la vía? ¿Que se necesita para que el efector alostérico de una enzima cambie el flujo de la vía? Las respuestas a estas preguntas se encuentran en la teoría del análisis de control metabólico, propuesta inicialmente por Heinrich y Rapoport (31-33) en Alemania y Kacser y Burns (34) en Edimburgo y desarrollada posteriormente por Reder (35) y Small y Fell (36,37) utilizando el álgebra de matrices. Para los lectores interesados que quieran profundizar en el tema de MCA (del inglés, Metabolic Control Analysis), Moreno-Sánchez y colaboradores tienen varias revisiones en las que

se desarrollan otros aspectos de la teoría que no se cubren aquí (38,39). Para dar respuesta a las preguntas iniciales, se van a definir los coeficientes de control de flujo y de concentración, las elasticidades, los teoremas de la suma y de la conectividad y el coeficiente de respuesta.

La figura 5 muestra una vía metabólica ramificada, en donde X_0 es el metabolito que alimenta a la vía y cuya concentración se mantiene constante (por ejemplo, la glucosa en sangre), S_1 , S_2 , y S_3 son intermediarios de la vía, sustratos y productos de las diferentes reacciones catalizadas por las enzimas E_1 , E_2 , E_3 , E_4 y E_5 , y X_1 y X_2 son los productos finales de la vía, y cuyas concentraciones también se mantienen constantes.

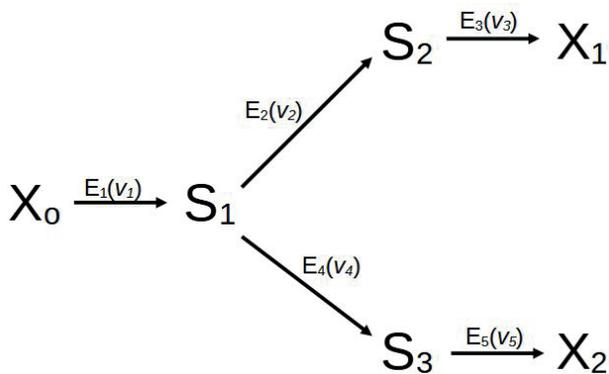


Figura 5. Vía metabólica ramificada.

En vez de considerar las concentraciones de las enzimas explícitamente, se puede utilizar las velocidades, ya que de acuerdo con la ecuación de M-M, la velocidad de la reacción catalizada es una función lineal de la concentración de la enzima. Las variables del sistema incluyen a las concentraciones de los intermediarios y el o los flujos (en nuestra vía metabólica tenemos 3 flujos: ($J_1 = v_1$), ($J_2 = v_2 = v_3$), y ($J_3 = v_4 = v_5$), mientras que los parámetros incluyen a la concentración de las enzimas, los parámetros cinéticos de éstas, como la k_{cat} o la V_{max} , la K_m , las constantes de inhibición y de activación, y finalmente las condiciones de frontera (X_0 , X_1 y X_2). El MCA (del inglés Metabolic Control Analysis) investiga la relación entre las variables y los parámetros en una vía metabólica. Flujo, actividad o velocidad, regulación, y control metabólico son algunos de los conceptos con los que se trabaja en MCA. El flujo indica la velocidad de un sistema formado por muchos componentes. Por ejemplo, el flujo de la glucólisis se puede determinar a través de la producción del piruvato por unidad de tiempo. Si no hay fugas en la vía, por ejemplo, que la glucosa se vaya a la vía de las fosfopentosas o la síntesis de glucógeno, el flujo también se puede determinar por el consumo de glucosa. En el modelo de vía metabólica propuesto, hay tres flujos: el asociado a la desaparición de X_0 , el que produce X_1 a partir de S_1 y el que forma X_2 a partir de S_1 . El flujo es una propiedad sistémica, mientras que la actividad o velocidad de una enzima, es una propiedad local (40). El término de control se refiere al ajuste en la salida de un sistema con el tiempo. Sugiere la capacidad de iniciar,

disminuir o aumentar. El control metabólico corresponde a la capacidad de cambiar el estado del sistema, ya sea el flujo o la concentración de un intermediario o la temperatura para otro tipo de sistemas, en respuesta a una señal externa (40,41). En contraste, la regulación está relacionada con el término de homeostasis y ocurre cuando el sistema mantiene alguna variable constante (temperatura, flujo) (40,41). Un ejemplo de la vida diaria es el funcionamiento de un refrigerador. Se puede disminuir o aumentar la temperatura del refrigerador (control), pero una vez que se llega a la temperatura deseada, la constancia de ésta va a depender del sensor y del sistema de retroalimentación del refrigerador (40). Regresando a la vía metabólica, uno de los objetivos es identificar las enzimas que controlan el flujo y la concentración de los intermediarios, y es aquí donde entran los coeficientes de control de flujo y de concentración.

Coficiente de control de flujo

El coeficiente de control de flujo (C_E^J) describe el cambio relativo en el flujo de una vía metabólica ($\Delta J/J$) en respuesta a un cambio relativo en la concentración ($\Delta E/E$) o en la actividad ($\Delta v/v$) de una enzima (40,41):

$$C_E^J = \frac{\delta J}{\delta E} \cdot \frac{E}{J} \sim \frac{\Delta J}{\Delta E} \cdot \frac{E}{J} = \frac{\frac{\Delta J}{J}}{\frac{\Delta E}{E}}$$

o utilizando la actividad de la enzima (v)

$$C_v^J = \frac{\delta J}{\delta v} \cdot \frac{v}{J} \sim \frac{\Delta J}{\Delta v} \cdot \frac{v}{J} = \frac{\frac{\Delta J}{J}}{\frac{\Delta v}{v}}$$

Los cambios en la concentración de enzima o en la actividad de la misma deben ser muy pequeños, infinitesimales. La figura 6 muestra que el cambio en v_3 , ya sea porque se aumentó o disminuyó la concentración de E_3 o por su activación o inhibición por efectores alostéricos, puede afectar positiva o negativamente los flujos v_1 , v_2 , v_4 y v_5 . Es decir, el cambio en la actividad de una enzima puede afectar diferentes flujos, dependiendo de la estructura de la vía (Figura 6).

Para una vía lineal, si se incrementa la concentración (o la actividad) de E_1 en 1%, el resultado sobre el flujo puede ser el siguiente: 1) que no cambie el flujo, lo que implicaría que E_1 no controla el flujo; 2) que el flujo aumente en 1%, y en este caso E_1 es, lo que se llamaba antes, la enzima limitante, la que controla la totalidad del flujo, y por tanto, el resto de las enzimas no tienen control y 3) que el flujo haya aumentado en cierto porcentaje, por ejemplo, 0.25%, por lo que se puede concluir que el control se reparte entre diferentes enzimas y que E_1 solamente controla el flujo en un 25%.

La figura 7 muestra un cálculo para una enzima que controla el 100% del flujo en una vía lineal:

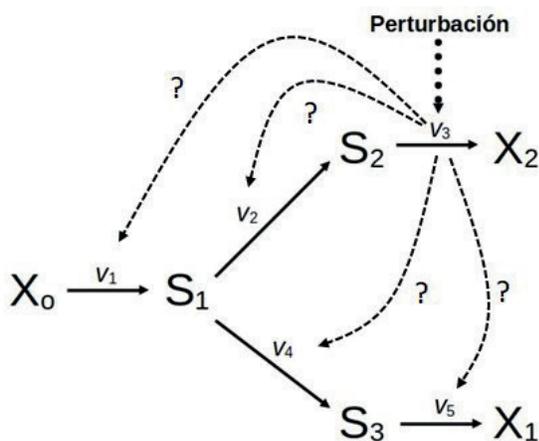


Figura 6. Los coeficientes de control de flujo cuantifican el efecto del cambio en la actividad de E₃ sobre los flujos de la vía.

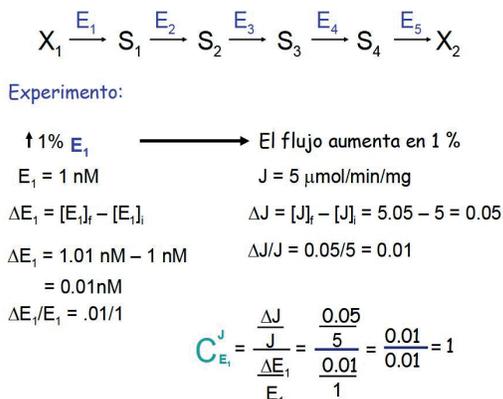


Figura 7. Cálculo del coeficiente de control de flujo cuando se incrementa en 1% la concentración o la actividad de E₁ que resulta en un incremento del 1% en el flujo de la vía.

Otro ejemplo. Supongamos que la concentración inicial de E₁ es de 1 nM y que por medio de procedimientos genéticos se aumenta su concentración a 1.01 nM, es decir, 1%. El cambio en la concentración de enzima es ΔE₁ = E_{1f} - E_{1i} = 0.01 nM. El cambio relativo en la concentración de enzima es 0.01 nM/1 nM = 0.01. Supongamos que con este cambio en la concentración de enzima, el flujo se incrementó de 5 a 5.025 μmol/min (ΔJ = 0.025). El cambio relativo en el flujo (ΔJ/J) = 0.025/5 = 0.005 (0.5%). El coeficiente de control de flujo de la enzima E₁ sobre el flujo J sería de 0.5.

$$C_{E_1}^J = \frac{\frac{\Delta J}{J}}{\frac{\Delta E_1}{E_1}} = \frac{\frac{0.025}{5}}{\frac{0.01}{1}} = \frac{0.005}{0.01} = 0.5$$

Es decir, el flujo de la vía está controlado en un 50% por E₁.

Coefficiente de control de concentración

El coeficiente de control de concentración describe el cambio relativo en la concentración de un metabolito (ΔS/S) como resultado de cambio relativo en la concentración (ΔE/E) o en la actividad (Δv/v) de una enzima (40,41):

$$C_E^S = \frac{\delta S}{\delta E} \cdot \frac{E}{S} \sim \frac{\Delta S}{\Delta E} \cdot \frac{E}{S} = \frac{\frac{\Delta S}{S}}{\frac{\Delta E}{E}}$$

La figura 8 muestra que al alterar la actividad de E₃ (v₃), esto puede dar lugar a un aumento o disminución de la concentración de S₁, S₂ y S₃. Es decir, se ve el efecto de cambiar la concentración o la actividad de una enzima sobre la concentración de los intermediarios de la vía metabólica.

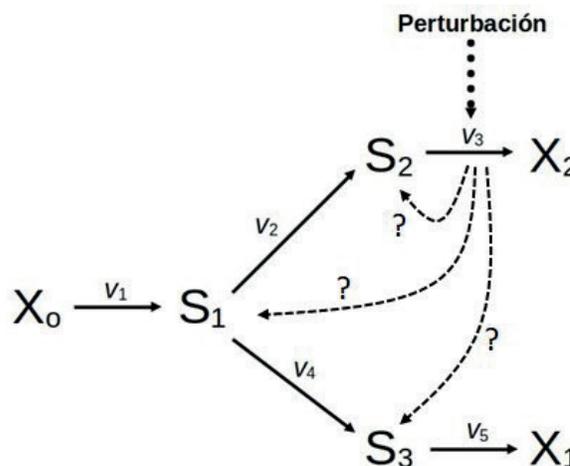


Figura 8. Los coeficientes de control de concentración cuantifican el efecto del cambio en la actividad de E₃ sobre la concentración de los metabolitos que forman parte de la vía metabólica.

Además, se esperaría que un incremento en la actividad de la enzima (por ejemplo, v₂) produzca una disminución en la concentración de su sustrato (S₁) y un aumento en la de su producto (S₂).

Elasticidades

En general, las elasticidades miden el efecto de un sustrato o producto sobre la actividad de una enzima. Su definición está dada por la siguiente expresión (40,41):

$$\epsilon_S^v = \frac{\delta v}{\delta S} \cdot \frac{S}{v} \sim \frac{\Delta v}{\Delta S} \cdot \frac{S}{v} = \frac{\frac{\Delta v}{v}}{\frac{\Delta S}{S}}$$

El coeficiente de elasticidad cuantifica el cambio relativo en la actividad de la enzima (Δv/v) en respuesta a un cambio relativo en la concentración del sustrato (ΔS/S) o del producto (ΔP/P) (40,41). En el gráfico de M-M (Figura 9), el coeficiente de elasticidad se obtiene a partir del valor de

la pendiente de la recta tangente en un punto de la curva, multiplicado por la concentración de sustrato para ese punto y dividido por la velocidad en ese punto (40,42):

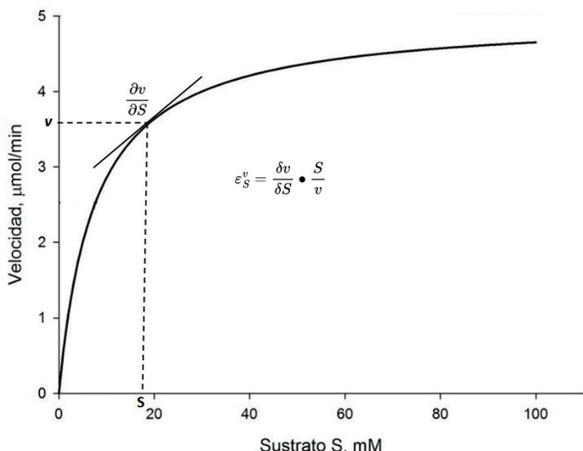


Figura 9. Explicación gráfica de la elasticidad de una enzima por su sustrato.

Es claro que el valor de las elasticidades depende de la zona de la curva. A concentraciones muy pequeñas de sustrato, condición en la cual la cinética es de primer orden, la elasticidad es igual a 1 (41). Es decir, que la velocidad es directamente proporcional a la concentración del sustrato. Cuando la enzima está saturada y se tiene una cinética de orden cero, el valor de la elasticidad es cero (41). Esto implica que la actividad de la enzima es insensible a los cambios pequeños en la concentración de sustrato. Si la enzima es cooperativa, en la región de máxima pendiente la elasticidad se acerca al coeficiente de Hill, parámetro que refleja la cooperatividad de una enzima (41).

Teoremas del análisis del control metabólico

Teoremas de suma

El primer teorema de la suma está relacionado con los coeficientes de control de flujo (40):

$$\sum_{i=1}^n C_{E_i}^J = 1$$

La suma de estos coeficientes es igual a 1. Este resultado indica que el control del flujo en una vía se distribuye entre todas las enzimas. Cuando una de ellas tiene un control de 1, el valor del coeficiente de control de flujo para el resto de las enzimas de la vía es cero, y por lo tanto, no ejercen control sobre el flujo. En este caso, se aplica el término de la etapa limitante.

El segundo teorema de la suma es para los coeficientes de control de concentración (40).

$$\sum_{i=1}^n C_{E_i}^S = 0$$

El control de una concentración se reparte entre todas las enzimas, algunas de las cuales tienen un control positivo, mientras que otras ejercen un control negativo.

Teoremas de conectividad

Los teoremas de conectividad relacionan los coeficientes de control (de flujo y de concentración) con las elasticidades. El teorema de la conectividad de los coeficientes de control de flujo está dado por la siguiente ecuación (40):

$$\sum_{i=1}^n C_{v_i}^J \epsilon_S^{v_i} = 0$$

mientras que la ecuación que describe al teorema de conectividad de los coeficientes de concentración es (40):

para $k \neq i$

y

$$\sum_{k=1}^n C_{v_k}^{S_h} \epsilon_{S_i}^{v_k} = 0$$

para $k = i$

$$\sum_{k=1}^n C_{v_k}^{S_h} \epsilon_{S_i}^{v_k} = -1$$

Como vamos a ver más adelante en un ejercicio sencillo, estos teoremas son importantes para calcular los coeficientes de control de flujo y de concentración a partir de las elasticidades.

Coficiente de Respuesta

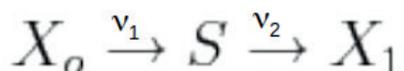
La concentración de una enzima en la célula y, por tanto, su actividad, puede cambiar debido a que se aumenta o disminuye su expresión, o se aumenta o disminuye su degradación (5). Sin embargo, otra manera de afectar la actividad de una enzima es a través de efectores alostéricos (5), y en este punto nos interesa predecir el efecto que van a tener los activadores e inhibidores sobre el flujo de una vía metabólica. Para esto, definimos el coeficiente de respuesta (42), que toma en cuenta la elasticidad de la enzima con respecto al modulador alostérico (A) y el coeficiente de control de flujo para esa enzima.

$$R_A^J = C_{v_1}^J \epsilon_A^{v_1}$$

Se puede ver que cuando el efector alostérico A no modifica la actividad de la enzima ($\epsilon = 0$) o cuando la enzima no tiene control sobre la vía metabólica ($C = 0$), entonces el compuesto A no produce un cambio en el flujo de la vía. En el otro extremo, si la elasticidad de A es de 2 (cooperatividad) y el coeficiente de control de flujo de la enzima es diferente de cero, entonces la presencia de A induce un cambio en el flujo de la vía.

Ejemplo: cálculo de los coeficientes de control a partir de las elasticidades

Se tiene la siguiente vía metabólica



formada por un solo intermediario (S), el metabolito que alimenta a la vía (X_0) y el producto final de la vía (X_1). Tanto X_0 como X_1 son condiciones de frontera y sus concentraciones se mantienen constantes. De acuerdo con los teoremas de la suma y de la conectividad de los coeficientes de control de flujo (42):

$$C_{v_1}^J + C_{v_2}^J = 1$$

$$C_{v_1}^J \epsilon_S^{v_1} + C_{v_2}^J \epsilon_S^{v_2} = 0$$

Se tiene un sistema de dos ecuaciones independientes con dos incógnitas, que corresponden a los dos coeficientes de control de flujo. El valor de las elasticidades son datos que se obtienen experimentalmente. Por tanto, no son incógnitas. Resolviendo las ecuaciones para las dos incógnitas, se obtienen dos ecuaciones que relacionan a los coeficientes de control de flujo con las elasticidades:

$$C_{v_2}^J = \frac{-\epsilon_S^{v_1}}{\epsilon_S^{v_2} - \epsilon_S^{v_1}}$$

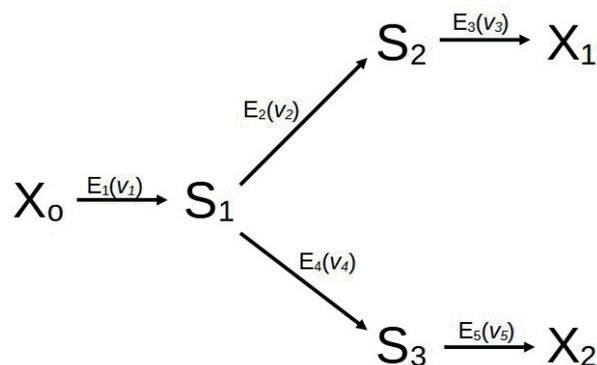
$$C_{v_1}^J = \frac{\epsilon_S^{v_2}}{\epsilon_S^{v_2} - \epsilon_S^{v_1}}$$

El mismo ejercicio se puede hacer con los coeficientes de control de concentración y su respectivo teorema de conectividad.

Un ejemplo de análisis de control metabólico con COPASI

Regresamos a la vía ramificada con la que hemos trabajado y el objetivo del análisis consiste en calcular los coeficientes de control de flujo, los de concentración y las elasticidades de las enzimas dados ciertos parámetros o mecanismos cinéticos que se asignan a cada uno de los pasos de la vía.

La vía metabólica se encuentra en un solo compartimiento, por lo que no hay reacciones de transporte a través de una membrana. A todas las reacciones se les asigna el mismo tipo de mecanismo cinético, la ley de acción de masas, pero irreversible para las etapas 1, 3 y 5, y reversible para las etapas 2 y 4. Las concentraciones de X_0 , X_1 y X_2 se mantienen fijas a 0.5 mol/L, mientras que a las concentraciones de S_1 , S_2 y S_3 se les asigna un valor inicial de 1 mol/L. Puesto que se conocen los mecanismos cinéticos de las enzimas involucradas en la vía metabólica, así como los valores de los



parámetros cinéticos asociados a cada enzima, es conveniente preguntar sobre el control que ejercen las enzimas sobre los flujos de la vía, o la concentración de los metabolitos en el estado estacionario, entre otras. Para contestar éstas y otras preguntas, utilizaremos COPASI (del inglés Complex Pathway Simulator) (<https://copasi.org/>) (43,44).

COPASI es un programa que sirve para construir y analizar modelos de vías metabólicas, ya sean lineales, ramificadas o cíclicas, asociando a cada etapa un mecanismo cinético, por ejemplo la ley de acción de masas, la cinética de Michaelis-Menten o cinética cooperativa, entre otras. En el laboratorio, el mecanismo cinético para cada una de las enzimas de la vía metabólica se obtiene a través de muchos experimentos, en donde se varían las concentraciones de los sustratos, los productos, los activadores e inhibidores, y que al final resulta en la propuesta de una ecuación de velocidad, es decir, de un mecanismo cinético de la enzima. Con base en nuestro ejemplo de vía metabólica, COPASI realiza diferentes tipos de análisis (43). Obtiene el flujo en estado estacionario, calcula la variación de los intermediarios en función del tiempo antes de que se alcance el estado estacionario, y calcula los coeficientes de control de flujo, de concentración y las elasticidades de los componentes del sistema.

El primer paso es definir los intermediarios (S_1 , S_2 , S_3) y sus concentraciones iniciales, así como los metabolitos que se mantienen fijos a una concentración determinada (X_0 , X_1 , X_2):

#	Name	Compartment	Type	Unit	Initial Concentration (Unit)
1	S1	Citosol	reactions	mol/l	1
2	S2	Citosol	reactions	mol/l	1
3	S3	Citosol	reactions	mol/l	1
4	X0	Citosol	fixed	mol/l	0.5
5	X1	Citosol	fixed	mol/l	0.5
6	X2	Citosol	fixed	mol/l	0.5
	New Species	Citosol	reactions	mol/l	1

En el siguiente paso se introducen las reacciones que definen la vía metabólica, se asignan los mecanismos cinéticos (ley de acción de masas irreversible y reversible en este ejemplo) y se dan valores a los parámetros cinéticos, en este caso, $k_1 = 0.1 \text{ s}^{-1}$:

Reaction v1

Reaction: $X_0 \rightarrow S_1$

Rate Law: Mass action (irreversible)

Rate Law Unit: mol/(l*s)

Role	Name	Mapping	Value	Unit
Parameter	k1	--local--	0.1	1/s
Substrate	substrate X0			mol/l

A continuación se calculan las concentraciones de los intermediarios S_1 , S_2 y S_3 cuando el sistema llega al estado estacionario (Tasks → Steady-State):

Steady State Result

A steady state with given resolution was found.

Species	Compartments	Model Quantities	Reactions	Stability	Jacobian (Comple)
Name	Type	Concentration [mol/l]	Rate [mol/(l*s)]	Transition Time [s]	
1 S1	reactions	0.6	1.39296e-17	12	
2 S2	reactions	0.2	-6.96481e-18	10	
3 S3	reactions	0.3	-1.39296e-17	10	

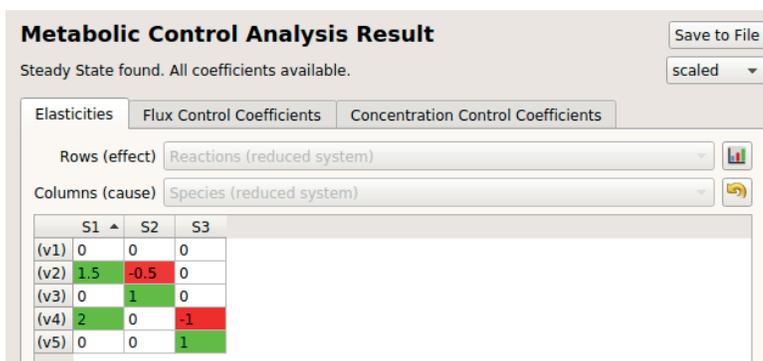
A partir de la concentración inicial de 1 mol/L, las concentraciones de S_1 , S_2 y S_3 en el estado estacionario alcanzan los valores de 0.6, 0.2 y 0.3 mol/L. Con respecto a los flujos en las diferentes ramas de la vía, se obtiene que el flujo en v_1 (J_1) es de 0.05 mol/s y que este se reparte entre las dos ramas con valores de 0.02 mol/s para la rama que comprende v_2 y v_3 (J_2), y de 0.03 mol/s para la rama v_4 y v_5 (J_3).

Steady State Result

A steady state with given resolution was found.

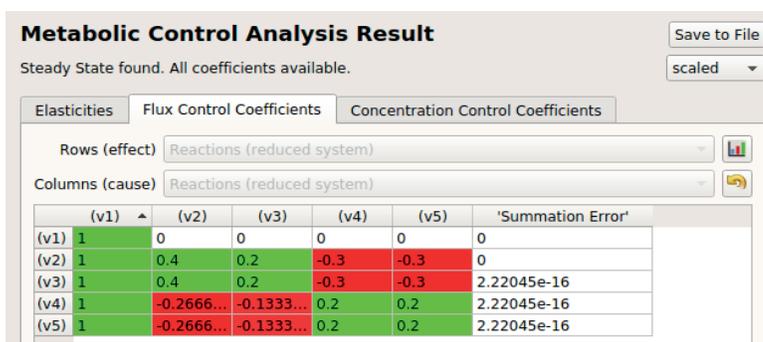
Species	Compartments	Model Quantities	Reactions	Stability	Jacobian (Comple)
Name	Flux (extensive) [mol/s]	Flux (intensive) [mol/(l*s)]	Reaction		
1 v1	0.05	0.05	$X_0 \rightarrow S_1$		
2 v2	0.02	0.02	$S_1 = S_2$		
3 v3	0.02	0.02	$S_2 \rightarrow X_1$		
4 v4	0.03	0.03	$S_1 = S_3$		
5 v5	0.03	0.03	$S_3 \rightarrow X_2$		

Debido a que las constantes de velocidad asignadas a la etapa reversible v_2 (0.05 s^{-1}) fueron más pequeñas que la de la etapa v_4 (0.1 s^{-1}), el flujo a través de v_2 fue menor que en v_4 . Asimismo, es a partir de v_1 que se obtienen los flujos de v_2 y v_4 , por lo que la suma de estos últimos corresponde al valor del flujo en v_1 . Finalmente, el flujo a través de v_2 y v_3 es el mismo, 0.02 mol/L , ya que el sistema se encuentra en estado estacionario. Lo mismo se aplica para el flujo a través de v_4 y v_5 . Como el sistema alcanza un estado estacionario, es posible calcular las elasticidades y los coeficientes de control de flujo y de concentración (Tasks → Metabolic Control Analysis). Con respecto a las elasticidades, se tienen los siguientes resultados:



Como era de esperarse, S_1 afecta en forma positiva a v_2 y v_4 , ya que es sustrato de esas reacciones. S_1 no afecta la actividad de v_1 porque esta reacción es irreversible y solamente depende de X_0 . Por otro lado, S_3 afecta en forma negativa a v_4 porque es producto de esta reacción reversible y estimula v_5 .

Con respecto a los coeficientes de control de flujo se obtuvieron los siguientes resultados:



Puesto que es una vía ramificada, se espera que los coeficientes tengan valores positivos y negativos. Es decir, que si aumenta el flujo de una rama, en la otra disminuye. La suma de los coeficientes de control de flujo para cada uno de los renglones es igual a 1, de acuerdo con el teorema de la suma. $E_1(v_1)$ tiene un coeficiente de control de flujo de 1 para todos los flujos. Es decir, que si se aumenta en 1% la concentración de E_1 , los flujos en v_1 ($J_1 = 0.05$), v_2 , v_3 ($J_2 = 0.02$) y v_4 , v_5 ($J_3 = 0.03$) aumentarán en 1%: $0.05 \rightarrow 0.0505$, $0.02 \rightarrow 0.0202$ y $0.03 \rightarrow 0.0303$, respectivamente. Las otras enzimas no tienen

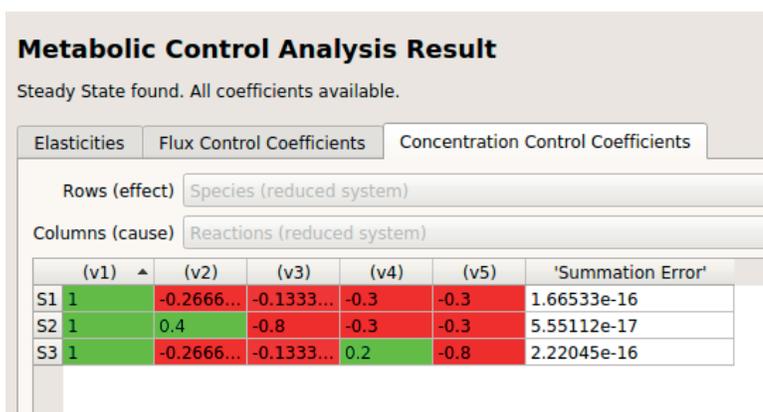
control (no afectan) sobre el flujo de la primera reacción, v_1 . $E_2(v_2)$ no tiene control sobre el flujo en v_1 ($FCC = 0$), controla el 40% del flujo en v_2 y v_3 (0.4) y con respecto a v_4 y v_5 , el coeficiente es negativo (-0.2666) debido a que al aumentar v_2 , disminuye el flujo sobre esta rama. Además, se puede comprobar que la suma de los coeficientes de control para un flujo dado (J_2) es uno:

$$C_{v_1}^{J_2} + C_{v_2}^{J_2} + C_{v_3}^{J_2} + C_{v_4}^{J_2} + C_{v_5}^{J_2} = 1$$

con los siguientes valores numéricos asociados a cada coeficiente:

$$1 + 0.4 + 0.2 - 0.3 - 0.3 = 1$$

COPASI da los siguientes resultados para los coeficientes de control de concentraciones:



La suma de los coeficientes de control de concentración para cada uno de los renglones es igual a 0, de acuerdo con el teorema de la suma. E_1 (v_1) tiene un coeficiente de control de concentración de 1 para todos los intermediarios (S_1 , S_2 , S_3). Es decir, que si se aumenta en 1% la concentración de E_1 , las concentraciones de S_1 , S_2 , S_3 aumentarán en 1%: $0.06 \rightarrow 0.0606 \rightarrow 0.0202$ y $0.03 \rightarrow 0.0303$, respectivamente. Las otras enzimas tienen control negativo sobre S_1 y esto se debe a que, en la vía metabólica, S_1 está detrás de las otras enzimas. Intuitivamente, al aumentar la actividad de una enzima decrece la concentración de su sustrato y aumenta la de su producto). Por esta razón, E_2 (v_2) tiene control positivo sobre S_2 , ya que éste es el producto de E_2 . También se puede comprobar que la suma de los coeficientes de control para un intermediario dado (S_i) es cero:

$$C_{v_1}^{S_1} + C_{v_2}^{S_1} + C_{v_3}^{S_1} + C_{v_4}^{S_1} + C_{v_5}^{S_1} = 0$$

con los siguientes valores numéricos asociados a cada coeficiente:

$$1 - 0.267 - 0.133 - 0.3 - 0.3 = 0$$

El análisis del control metabólico tiene gran importancia en el campo de la Ciencia Básica, la Medicina y la Biotecnología. Por ejemplo, en la caracterización de la glucólisis en *Entamoeba histolytica* (45) o en *Saccharomyces cerevisiae* (46), para estudiar el control de la síntesis de glucógeno en los hepatocitos (47), la síntesis de glicerol en la levadura (48) o los cambios en el control del flujo en las vías metabólicas en las células cancerosas y en el probable tratamiento contra esta enfermedad (39). También, el MCA se ha utilizado en la búsqueda de blancos farmacológicos (49) y en la optimización en la producción de compuestos como el etanol (50,51).

Biología de sistemas

En esta revisión comenzamos con el estudio de las enzimas, las cuales se purificaron y se caracterizaron desde un punto cinético, y uno de los objetivos era obtener la ecuación de velocidad que incluyera la concentración de sustratos y productos, y en cada caso particular, el efecto de inhibidores y activadores. Por ejemplo, los hidrogeniones, el calcio, el magnesio, o moléculas orgánicas que se producen en la célula pueden regular la actividad de las enzimas. De aquí pasamos a estudiar el comportamiento del conjunto de enzimas que forman una vía metabólica, sea lineal, cíclica o ramificada. Como ejemplo, se podría trabajar con la glucólisis, el ciclo de Krebs o la síntesis de glucógeno, entre otras. El objetivo era cuantificar el efecto de una enzima, un sustrato, un producto o un modificador sobre el flujo de la vía metabólica. Por tanto, se definieron los coeficientes de control (de flujo y de concentración), las elasticidades y los coeficientes de respuesta. Los primeros miden, entre otras cosas, el efecto de una enzima sobre el flujo de la vía. Para analizar el comportamiento dinámico de una vía metabólica se toman en cuenta las ecuaciones de velocidad de las diferentes enzimas,

con sus valores de V_{\max} , los cuales incluyen la concentración de la enzima ($V_{\max} = k_{\text{cat}} \times E_0$), las concentraciones iniciales de ciertos metabolitos y, a través de programas como COPASI, se deduce el sistema de ecuaciones diferenciales y se obtienen los coeficientes de control y las elasticidades para cada enzima del sistema, junto con los flujos y las concentraciones de los metabolitos en estado estacionario.

En esta última parte pasamos de la vía metabólica al metabolismo completo de la célula, entendiéndolo como el total de las reacciones químicas y de transporte -que ocurren en las diferentes membranas celulares- que se dan en una célula o en un organismo. En esta red metabólica se acoplan reacciones catabólicas, en las que se degradan moléculas complejas para producir ATP, NADH y NADPH, con reacciones anabólicas, en las que se usan estos compuestos para la síntesis de ácidos grasos, glucógeno y diferentes tipos de macromoléculas. Sin embargo, el enfoque que se utilizó en el análisis de control metabólico no se puede aplicar a la totalidad del metabolismo, entre otras cosas debido al desconocimiento de la cinética de la mayoría de las enzimas y a la enorme complejidad del sistema. Y aquí entramos en el campo de la biología de sistemas (systems biology, en inglés). De acuerdo con Wikipedia, la biología de sistemas es el análisis computacional y matemático y el modelado de sistemas biológicos complejos, en el que participan diferentes disciplinas y con un enfoque holístico para estudiar las interacciones complejas de un sistema (https://en.wikipedia.org/wiki/Systems_biology).

La biología de sistemas es importante en muchos campos de investigación. En Medicina, a través de estos modelos de la red metabólica, se estudia, desde un punto de vista integral, enfermedades como la diabetes (52-54), la obesidad (55,56), el cáncer (57-58) y otras (60). Asimismo, con este enfoque se puede identificar a ciertas enzimas u organelos como blancos farmacológicos para el tratamiento de ciertos padecimientos. En Biotecnología, la biología de sistemas se utiliza para optimizar el metabolismo de una célula para la producción de compuestos de interés comercial (61-66). Desde un punto de vista de la fisiología celular, nos permite entender la respuesta de la célula a mutaciones y a diferentes condiciones ambientales (67-71).

A diferencia de los modelos dinámicos, como los que se crean con COPASI, en los modelos de biología de sistemas que se van a describir más adelante se considera que el sistema está en estado estacionario, lo que implica que los flujos son constantes para cada reacción. Debido a su estructura, ni la concentración de los metabolitos ni las actividades enzimáticas se toman en cuenta. Aquí vamos a revisar la construcción de modelos metabólicos a partir de genomas (Genome-Scale Metabolic Model, GEM, por sus siglas en inglés). Puesto que hay más de 200,000 genomas de bacterias y arqueas secuenciados (72), más de 1,500 genomas de hongos (73), 798 genomas de plantas (74) y 3278 de animales (75), la selección del genoma del organismo de interés no va a ser un problema. Con base en el genoma y a través de

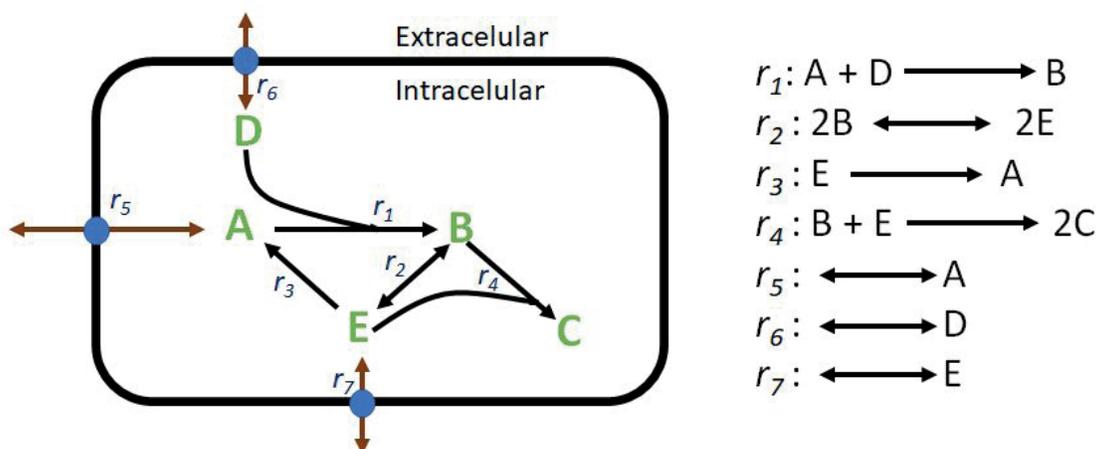


Figura 10. Esquema de una célula con 7 reacciones, de las cuales 3 son de transporte a través de la membrana. A la derecha se describen las reacciones, algunas de las cuales son reversibles y otras son irreversibles (modificado de (78)).

ciertos programas de cómputo (Tabla 1), se obtiene una lista de todo el conjunto de reacciones químicas de una célula (GEM) (Figura 10) y una matriz estequiométrica (Figura 11), que, en un caso más realista, contiene las reacciones químicas y de transporte de una célula y que incluye todos los compartimentos celulares, como la mitocondria, el retículo endoplásmico y los peroxisomas, entre otros. Por ejemplo, el GEM de *Pichia pastoris* incluye 1202 reacciones que se

reparten en 8 compartimentos: el citoplasma, la mitocondria, el peroxisoma, la vacuola, el retículo endoplásmico y el espacio extracelular. Además, incluye 328 reacciones de transporte y 1147 metabolitos (76,77).

El pequeño modelo metabólico a escala genómica que utilizaremos como ejemplo, consta de cuatro reacciones químicas (r_1, r_2, r_3, r_4) y tres reacciones de transporte (r_5, r_6 y r_7) (Figura 11).

$$\mathbf{S} = \begin{matrix} & \begin{matrix} r_1 & r_2 & r_3 & r_4 & r_5 & r_6 & r_7 \end{matrix} \\ \begin{matrix} A \\ B \\ C \\ D \\ E \end{matrix} & \begin{vmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & -2 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 2 & -1 & -1 & 0 & 0 & 1 \end{vmatrix} \end{matrix} \quad \mathbf{v} = \begin{vmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \end{vmatrix}$$

Figura 11. Matriz estequiométrica y vector de velocidades para las reacciones descritas en la figura 10 (modificado de (78)).

A partir de esta red metabólica se construye la matriz estequiométrica \mathbf{S} , una representación matemática que contiene la información de todas las reacciones que forman parte del metabolismo de la célula. En las columnas de \mathbf{S} se representan las reacciones (r_1 - r_7) y en los renglones los metabolitos (A-E). Además, se genera un vector \mathbf{v} con los flujos asociados a cada una de las reacciones (\mathbf{v}):

Para la reacción r_1 , A y D son los sustratos y B el producto, y todos los participantes tiene coeficientes estequiométricos de 1 (Figura 11). Por tanto, la desaparición de A y D se asocia con un valor negativo, de -1, y la producción de B con un positivo, de 1. Esto se muestra en la columna r_1 de la matriz

\mathbf{S} , en donde las entradas para A y D tienen un valor de -1 y la de B un valor de 1. En las otras columnas se representan las demás reacciones de nuestra pequeña vía metabólica.

La variación de cada uno de los metabolitos con respecto al tiempo está dada por la siguiente ecuación:

$$d\mathbf{M}/dt = \mathbf{S} * \mathbf{v}$$

en donde \mathbf{M} es el vector de las concentraciones (A, B, C, D y E), \mathbf{S} es la matriz estequiométrica y \mathbf{v} el vector de flujos (en negritas se representan los vectores). En estado estacionario, la variación de los metabolitos con respecto al tiempo es cero:

$$d\mathbf{M}/dt = \mathbf{S} * \mathbf{v} = \mathbf{0}$$

Por tanto, para nuestro ejemplo:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{d}{dt} \begin{pmatrix} A \\ B \\ C \\ D \\ E \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & -2 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 2 & -1 & -1 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \bullet \begin{pmatrix} V_1 \\ V_2 \\ V_3 \\ V_4 \\ V_5 \\ V_6 \\ V_7 \end{pmatrix} = 0$$

Una vez construido el modelo, hay que probar si predice el comportamiento de la célula en diferentes condiciones experimentales. Por ejemplo, diferentes fuentes de carbono o nitrógeno. Para esto, se utiliza el Análisis de Balance de Flujo (Flux Balance Analysis, FBA por sus siglas en inglés). El FBA es un método matemático que utiliza programación lineal para simular el metabolismo y obtener una solución al sistema de ecuaciones descrito por $S^*v = 0$ (modelo metabólico a escala genómica) (42,79). La solución contiene los flujos para cada reacción en el modelo, en el estado estacionario, para ciertas condiciones experimentales (79). Los valores de ciertas variables se obtienen por medio del experimento. Por ejemplo, en nuestro modelo minimalista, utilizando un quimiostato, se obtienen los flujos de A, D y E. En un esquema más realista, A podría ser la velocidad del consumo de glucosa, D la de la producción de etanol y E la de dióxido de carbono; es decir, estos flujos se determinan en forma experimental. Para obtener los flujos a través de todas las reacciones del sistema, se necesita incluir ciertas restricciones, como la de balance de masa, que implica que la velocidad de producción y de consumo de un metabolito son iguales ($S^*v = 0$), las relacionadas con las capacidades de las enzimas, en donde se asignan valores a los límites inferiores y superiores para las velocidades enzimáticas ($v_{\min} < v < v_{\max}$), y una función objetivo, que la más frecuente es el crecimiento o producción de biomasa, que se tiene que maximizar. Cabe mencionar que existen varios programas para realizar este tipo de análisis y que son gratuitos (80).

La biomasa corresponde a las demandas metabólicas de los precursores y cofactores que se necesitan para formar 1 g de peso seco. En la fórmula de biomasa se incluyen aminoácidos, fosfolípidos, ácidos grasos, carbohidratos, ácidos ribonucleicos y desoxirribonucleicos, coenzimas y el gasto de ATP. Lo ideal es obtener la biomasa a través de la cuantificación experimental (81). Por ejemplo, Vetle y colaboradores reportan que para un gramo de peso seco de *Escherichia coli*, la proteína es la que contribuye más, con un 55%, le sigue el RNA con 20.5%, el DNA con un 3.1% y los lípidos con un 9.1%, entre otros. Si tomamos en cuenta solamente al RNA, el AMP corresponde al 5.4%, el GMP al 7%, el CMP al 3.8% y el UMP al 4.2%, para dar un total de

20.5%. Para la alanina, por ejemplo, su porcentaje es de 3.9%. De esta manera, construimos la fórmula de la biomasa que incluye el gasto de ATP y aproximadamente 47 metabolitos que están involucrados en la síntesis de la biomasa (81). En resumen, para el análisis de balance de flujos se maximiza la generación de biomasa (crecimiento), se imponen límites a las velocidades de las enzimas y se supone estado estacionario, en donde hay un balance de masas. Para nuestro modelo mínimo, las restricciones impuestas serían:

Balance de masa en estado estacionario: $S^*v = 0$

Añadir restricciones:

$$10 < v_1 < 100$$

$$5 < v_2 < 100$$

$$1 < v_3 < 10$$

$$0 < v_4 < 50$$

$$-10 < v_5 < 100$$

$$-10 < v_6 < 100$$

$$-10 < v_7 < 100$$

Y maximizar la producción de E

Optimizar: $\max\langle c^*v \rangle$ dado $S^*v = 0$

en donde $c = [0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 1]^T$

Aplicaciones de GEM y FBA

a) Predicción del fenotipo

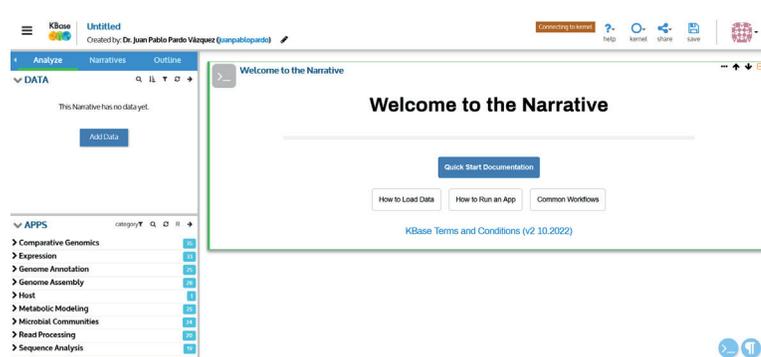
Para *E. coli* y *S. cerevisiae* se conoce el efecto de quitar cada uno de los genes sobre su capacidad de crecimiento, tanto en medios de cultivo mínimos como medio de cultivo rico. De esta manera, quitar genes *in silico*, en el modelo metabólico, es una manera de comprobar la validez del modelo. Al comparar los resultados del modelo metabólico con los resultados experimentales, se tiene que aproximadamente un 80-85% de las predicciones fueron consistentes con el experimento (82). Asimismo, se puede predecir la distribución de los flujos intracelulares, a través de todas las vías metabólicas, en cada una de las mutantes en donde se eliminó un gen y que todavía tiene la capacidad de crecer (82). En este sentido, el modelo metabólico también debe ser capaz de predecir el crecimiento de la célula en diferentes fuentes de carbono y de

nitrógeno, en medio de cultivo mínimo o suplementado con ciertas vitaminas o aminoácidos en caso de auxotrofia. Los resultados de FBA en diferentes medios deben concordar con los resultados experimentales. Es decir, aunque el genoma nos permitió construir un modelo metabólico de la célula, éste se tiene que refinar con base en información bioquímica y de fisiología celular; la adecuación del modelo a los datos experimentales se realiza a través del FBA.

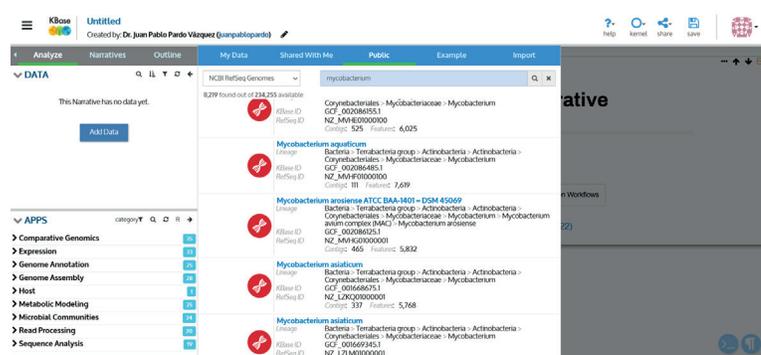
b) Aplicaciones biotecnológicas

Los modelos metabólicos se utilizan para diseñar cepas que tengan la capacidad de producir, en grandes cantidades, un compuesto de interés comercial. Por ejemplo, en la producción de proteínas recombinantes en levaduras (66) o de compuestos con la estructura terpenoide (64).

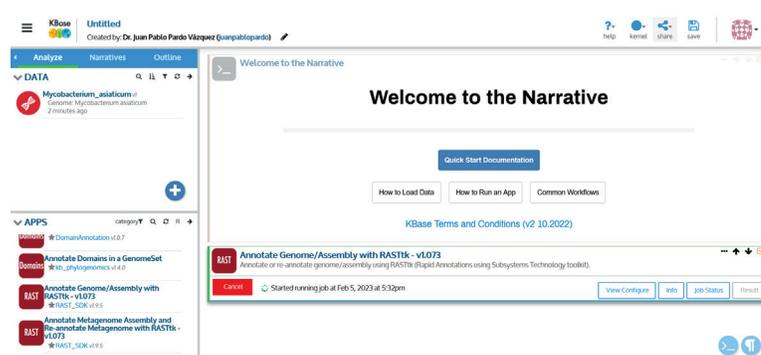
1) Cargar un genoma en el espacio de la Narrativa. Empezamos con la página inicial del Kbase (<https://www.kbase.us/>), en donde se da la bienvenida a la Narrativa. El cuadro de la Narrativa es el que está en la parte izquierda. Seleccionamos “AddData”



y aparecen varias opciones para añadir un genoma o inclusive un modelo a la Narrativa. Este puede estar en mis datos (My Data), o es un genoma que está compartido (Shared With Me), o es del dominio público (Public), o en caso de que quiera practicar un poco, tomo la información de los ejemplos (Example) o subo un genoma que obtuve de otra base de datos, como NCBI (Import). En este ejemplo vamos a seleccionar un genoma que es público: *Mycobacterium aquaticum* y lo añadimos a la Narrativa.



2) Anotar el genoma con RAST. En el siguiente paso anotamos el genoma. La anotación del genoma se realiza para identificar los elementos funcionales en la secuencia de DNA del genoma, de tal suerte que se le da un significado a esa secuencia. De aquí salen nombres de enzimas y proteínas que corresponden a cada gen.



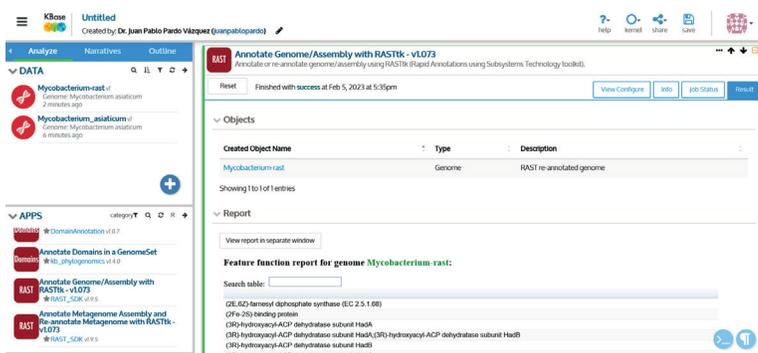
c) Aplicaciones biomédicas

Se utilizan los modelos para predecir blancos farmacológicos para el tratamiento de enfermedades (59,83,84), conocer la fisiología de las células cancerosas (85-87). Otro ejemplo es la construcción de 7302 modelos metabólicos de microorganismos de la microbiota del ser humano con el fin de desarrollar una medicina personalizada (88).

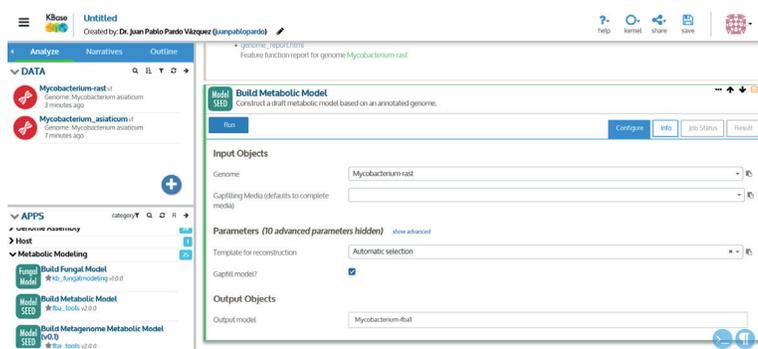
Construcción de un modelo metabólico con Kbase

Aunque hay muchos programas para construir el GEM de un organismo (89), aquí se va a utilizar el programa en línea Kbase (90,91). Los pasos para construir en esta plataforma un modelo metabólico a partir de un genoma son los siguientes:

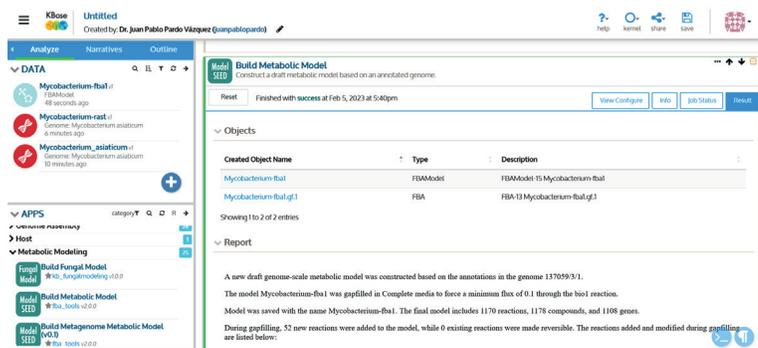
El resultado es un archivo que aquí lo llamamos Mycobacterium-rast y que aparece en el cuadro de la Narrativa. También obtenemos una lista de todas las enzimas que encontró el programa en el genoma del organismo.



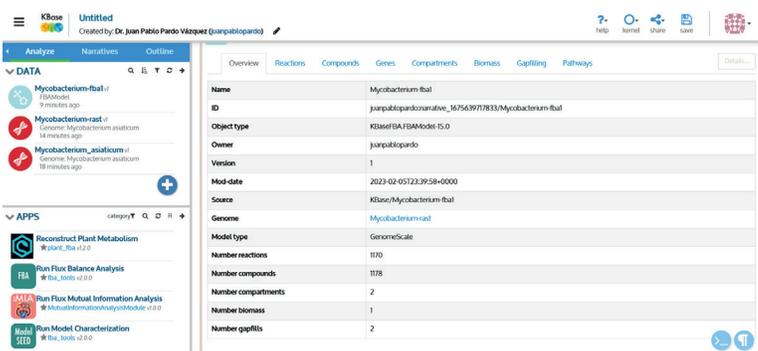
3) Construir un modelo metabólico inicial utilizando un medio de cultivo, que puede ser el medio completo o un medio mínimo. En esta etapa se utiliza la opción “Build Metabolic Model”. Se introduce el archivo del genoma que se va a usar, el medio de cultivo (en este ejemplo es el completo) y el nombre del modelo de salida (Mycobacterium-fba1):



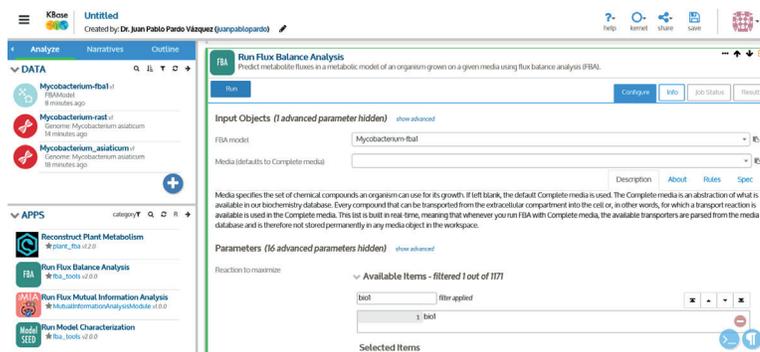
La construcción del modelo se lleva a cabo en poco tiempo. La obtención del modelo se basó en el genoma anotado y se llenaron ciertos huecos en la red metabólica para que el organismo pudiera crecer en el medio completo, con un flujo mínimo de 0.1 a través de la reacción de la producción de biomasa (bio1). Se añadieron 52 reacciones al modelo.



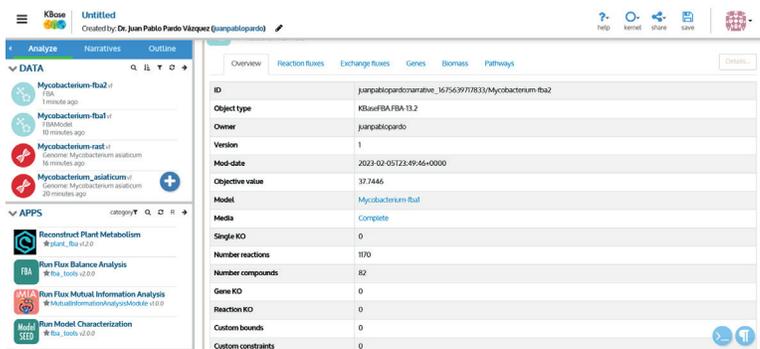
El modelo resultante tiene 1170 reacciones, 1178 compuestos, 2 compartimientos (extracelular e intracelular), 1 reacción de biomasa y 2 huecos (gaps) que se llenaron.



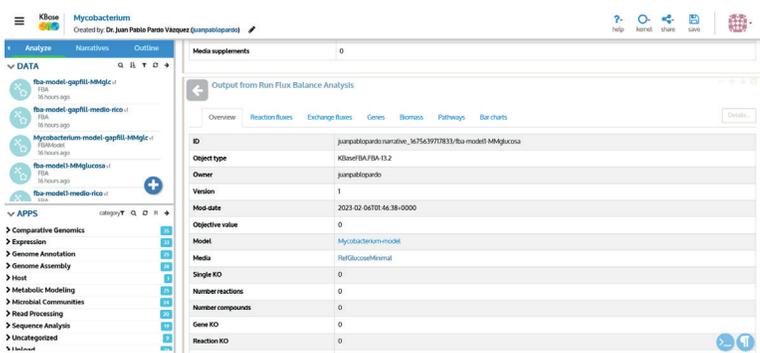
4) Realizar el análisis de balance de flujo utilizando un medio de cultivo. Para validar el modelo metabólico a escala genómica, se realiza el análisis de balance de flujo. Se selecciona la opción “Run Flux Balance Analysis”, se introduce el modelo sobre el cual se va a trabajar (*Mycobacterium-fba1*), se selecciona el medio de cultivo (completo), y la función objetivo que se va a maximizar: la reacción de formación de biomasa, bio1.



Se oprime el botón de Run y el resultado muestra que la bacteria crece en medio completo. La función objetivo fue de 37.7446.

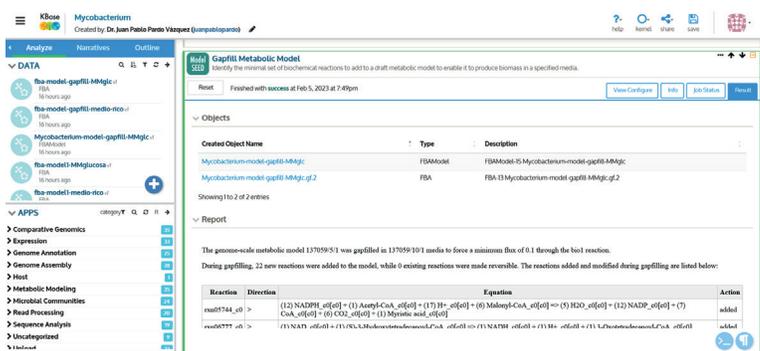


Se realizó un segundo análisis de balance de flujo, pero ahora con medio mínimo con glucosa y el resultado fue que no hubo crecimiento. El valor objetivo fue de 0.

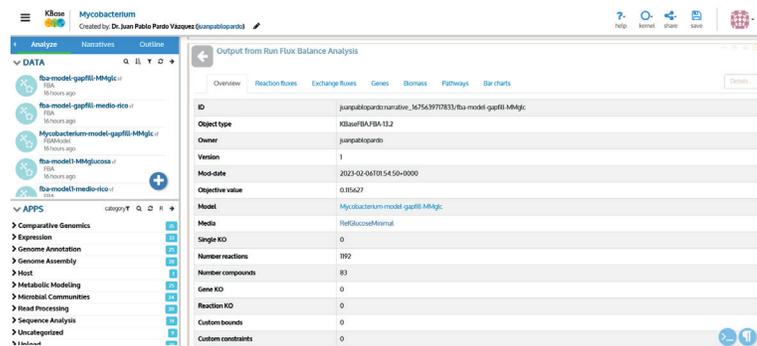


Es claro que la falta de ciertas vías en el modelo explica el nulo crecimiento de las células.

5) Con base en datos experimentales, probar diferentes medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno. Suponiendo que *Mycobacterium aquaticum* puede crecer en medio mínimo con glucosa y con amonio como fuente de nitrógeno, entonces hay que llenar los huecos en el metabolismo para que esto sea posible. Para esto, se utiliza la opción “Gapfill Metabolic Model”, se selecciona el modelo sobre el que va a trabajar, el medio de cultivo (medio mínimo con glucosa) y se lleva a cabo el procedimiento de la construcción del nuevo modelo.



La adición de 22 reacciones al modelo ahora permite el mínimo crecimiento de la célula (valor objetivo de 0.115627)



Hay que tener cuidado a la hora de refinar los modelos. Aunque el medio de cultivo que utilizamos en este ejemplo se seleccionó de manera arbitraria, pudo haber sido etanol, acetato o cualquier fuente de carbono, para construir el modelo metabólico de un organismo se debe tomar en cuenta información experimental. Por ejemplo, se conocen las fuentes de carbono en las que crecen algunos microorganismos de interés comercial y científico, como *E. coli* o *S. cerevisiae* y, por tanto, son estas fuentes de carbono las que se deben usar para refinar el modelo. Una vez que se tiene el modelo metabólico de un organismo, con Kbase se puede realizar la delección *in silico* de cada uno de los genes del organismo y observar su efecto sobre el crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, también se puede comparar la expresión de genes que se tuvo en un experimento de transcriptómica en ciertas condiciones experimentales con el flujo calculado en el modelo, o comparar dos o más modelos. Para terminar esta historia, es importante mencionar que las publicaciones de Biología de Sistemas en hongos, plantas, mamíferos y bacterias han tenido un crecimiento exponencial. Por ejemplo, se reportan 205,906 artículos con el tema de Systems Biology en una búsqueda realizada el 23 de marzo de 2023 en PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Con respecto al ser humano, esta investigación incide en el estudio integral de varios tipos de cáncer y de enfermedades degenerativas y en el descubrimiento de nuevos blancos farmacológicos.

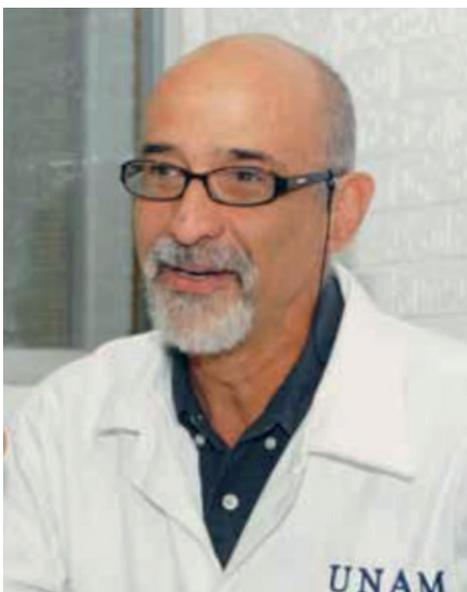
Referencias

1. Heckmann, C. M., and Paradisi, F. (2020) Looking Back: A Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools. *ChemCatChem*. **12**, 6082–6102.
2. Kohler, R. (1971) The background to Eduard Buchner's discovery of cell-free fermentation. *J. Hist. Biol.* **4**, 35–61.
3. Buchner, E. (1897) Alkoholische Gährung ohne Hefezellen. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **30**, 117–124.
4. Segel, I. H. (2001) *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, Wiley Classics Library ed., [10. print.], A Wiley-Interscience publication, Wiley, New York.
5. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2013) *Lehninger principles of biochemistry*, 6th ed, W.H. Freeman, New York.
6. Simoni, R. D., Hill, R. L., and Vaughan, M. (2002) Urease, the First Crystalline Enzyme and the Proof That Enzymes Are Proteins: the Work of James B. Sumner. *J. Biol. Chem.* **277**, e1–e2.
7. Sanger, F. (1952) The Arrangement of Amino Acids in Proteins. in *Advances in Protein Chemistry* (Anson, M. L., Bailey, K., and Edsall, J. T. eds), pp. 1–67, Academic Press, 7, 1–67.
8. Johnson, K. A., and Goody, R. S. (2011) The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *ACS Publ.* **10**.1021/bi201284u.
9. Koshland, D. E. (1958) Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**, 98–104
10. Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., and Phillips, D. C. (1958) A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*. **181**, 662–666.
11. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463–5467
12. Kaunitz, J. D. (2015) The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Dig. Dis. Sci.* **60**, 2230–2231.
13. Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335–350.
14. Deepak, S., Kottapalli, K., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K., Iwahashi, H., Masuo, Y., and Agrawal, G. (2007) Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr. Genomics*. **8**, 234–251
15. Senior, A. W., Evans, R., Jumper, J., Kirkpatrick, J., Sifre, L., Green, T., Qin, C., Židek, A., Nelson, A. W. R., Bridgland, A., Penedones, H., Petersen, S., Simonyan, K., Crossan, S., Kohli, P., Jones, D. T., Silver, D., Kavukcuoglu, K., and Hassabis, D. (2020) Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature*. **577**, 706–710.
16. Chang, R., and Chang, R. (2000) *Physical chemistry for the chemical and biological sciences*, University Science Books, Sausalito, Calif.
17. Fersht, A. (1999) *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*, W.H. Freeman, New York.
18. Siffert, W., and Gros, G. (1984) Carbonic anhydrase in human platelets. *Biochem. J.* **217**, 727–730.
19. Vugt-Lussenburg, B. M. A. van, Weel, L. van der, Hagen, W. R., and Hagedoorn, P.-L. (2013) Biochemical Similarities and Differences between the Catalytic [4Fe-4S] Cluster Containing Fumarases FumA and FumB from *Escherichia coli*. *PLOS ONE*. **8**, e55549.

20. Putman, S. J., Coulson, A. F., Farley, I. R., Riddleston, B., and Knowles, J. R. (1972) Specificity and kinetics of triose phosphate isomerase from chicken muscle. *Biochem. J.* **129**, 301–310.
21. Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D., and Knowles, J. R. (1988) Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Appendix: Analysis of triose phosphate equilibria in aqueous solution by ³¹P NMR. *Biochemistry.* **27**, 1158–1167.
22. Voet, D., and Voet, J. G. (2011) *Biochemistry*, 4th ed, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ
23. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2012) *Biochemistry: this edition is for use outside the USA and Canada*, 7. ed., international ed., [Nachdr.], Freeman, Palgrave Macmillan, New York, NY.
24. Garcia-Sevilla, F., Arribas E, Bisswanger H, Garcia-Moreno M, Garcia-Canovas F, de Guevara RGL, Duggleby R G, Yago JM, and Varon R wREFERASS: Rate equations for enzyme reactions at steady state under MS-Windows. *Match Commun. Math. Comput. Chem.* **63**, 553–571.
25. Varon, R., Garcia-Sevilla, F., Garcia-Moreno, M., Garcia-Canovas, F., Peyro, R., and Duggleby, R. G. (1997) Computer program for the equations describing the steady state of enzyme reactions. *Comput. Appl. Biosci.* **13**, 159–167.
26. Lineweaver, H., and Burk, D. (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658–666.
27. Northrop, D. B. (1998) On the Meaning of Km and V/K in Enzyme Kinetics. *ACS Publ.* 10.1021/ed075p1153.
28. Dalziel, K., Dam, H., Moutschen-Dahmen, M., Noer, B., and Reio, L. (1957) Initial Steady State Velocities in the Evaluation of Enzyme-Coenzyme-Substrate Reaction Mechanisms. *Acta Chem. Scand.* **11**, 1706–1723.
29. Northrop, D. B. (1998) On the Meaning of Km and V/K in Enzyme Kinetics. *J. Chem. Educ.* **75**, 1153.
30. Park, C. (2022) Visual Interpretation of the Meaning of kcat/KM in Enzyme Kinetics. *J. Chem. Educ.* **99**, 2556–2562.
31. Heinrich, R., and Rapoport, T. A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* **42**, 89–95.
32. Heinrich, R., and Rapoport, T. A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* **42**, 89–95.
33. Rapoport, T. A., Heinrich, R., Jacobasch, G., and Rapoport, S. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **42**, 107–120
34. Kacser, H., and Burns, J. A. (1973) The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**, 65–104.
35. Reder, C. (1988) Metabolic control theory: a structural approach. *J. Theor. Biol.* **135**, 175–201.
36. Small, J. R., and Fell, D. A. (1990) Metabolic control analysis. Sensitivity of control coefficients to elasticities. *Eur. J. Biochem.* **191**, 413–420.
37. Small, J. R., and Fell, D. A. (1989) The matrix method of metabolic control analysis: its validity for complex pathway structures. *J. Theor. Biol.* **136**, 181–197.
38. Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., Rodríguez-Enríquez, S., and Olin-Sandoval, V. (2008) Metabolic Control Analysis: A Tool for Designing Strategies to Manipulate Metabolic Pathways. *BioMed Res. Int.* 2008, e597913.
39. Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., Rodríguez-Enríquez, S., Gallardo-Pérez, J. C., Quezada, H., and Westerhoff, H. V. (2010) Metabolic control analysis indicates a change of strategy in the treatment of cancer. *Mitochondrion.* **10**, 626–639.
40. Fell, D. (2007) *Understanding the control of metabolism*, Repr., Frontiers in metabolism, Portland Press, London
41. Sauro, H. M. (2017) Control and regulation of pathways via negative feedback. *J. R. Soc. Interface.* **14**, 20160848.
42. Sauro, H. M. (2013) *Systems biology: an introduction to metabolic control analysis*, 1st edition, version 1.01, Ambrosius Publishing, New York, NY.
43. Mendes, P., Hoops, S., Sahle, S., Gauges, R., Dada, J., and Kummer, U. (2009) Computational modeling of biochemical networks using COPASI. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* **500**, 17–59.
44. Hoops, S., Sahle, S., Gauges, R., Lee, C., Pahle, J., Simus, N., Singhal, M., Xu, L., Mendes, P., and Kummer, U. (2006) COPASI--a Complex PATHway SIMulator. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **22**, 3067–3074.
45. Saavedra, E., Encalada, R., Pineda, E., Jasso-Chávez, R., and Moreno-Sánchez, R. (2005) Glycolysis in *Entamoeba histolytica*. *FEBS J.* **272**, 1767–1783.
46. Kroukamp, O., Rohwer, J. M., Hofmeyr, J. H. S., and Snoep, J. L. (2002) Experimental supply-demand analysis of anaerobic yeast energy metabolism. *Mol. Biol. Rep.* **29**, 203–209.
47. Metabolic control analysis of hepatic glycogen synthesis in vivo 10.1073/pnas.1921694117.
48. Petelenz-Kurziel, E., Kuehn, C., Nordlander, B., Klein, D., Hong, K.-K., Jacobson, T., Dahl, P., Schaber, J., Nielsen, J., Hohmann, S., and Klipp, E. (2013) Quantitative analysis of glycerol accumulation, glycolysis and growth under hyper osmotic stress. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003084.
49. Eisenthal, R., and Cornish-Bowden, A. (1998) Prospects for antiparasitic drugs. The case of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of African sleeping sickness. *J. Biol. Chem.* **273**, 5500–5505.
50. Fell, D. A. (1998) Increasing the flux in metabolic pathways: A metabolic control analysis perspective. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 121–124
51. Bowden, A. C. (1999) Metabolic control analysis in biotechnology and medicine. *Nat. Biotechnol.* **17**, 641–643.
52. Martínez-López, Y. E., Esquivel-Hernández, D. A., Sánchez-Castañeda, J. P., Neri-Rosario, D., Guardado-Mendoza, R., and Resendis-Antonio, O. (2022) Type 2 diabetes, gut microbiome, and systems biology: A novel perspective for a new era. *Gut Microbes.* **14**, 2111952.
53. Moore, J. B. (2019) From sugar to liver fat and public health: systems biology driven studies in understanding non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Proc. Nutr. Soc.* **78**, 290–304.
54. Hossain, M. A., Al Ashik, S. A., Mahin, M. R., Al Amin, M., Rahman, M. H., Khan, M. A., and Emran, A. A. (2022) Systems biology and in silico-based analysis of PCOS revealed the risk of metabolic disorders. *Heliyon.* **8**, e12480.
55. Mateus Pellenz, F., Crispim, D., and Silveira Assmann, T. (2022) Systems biology approach identifies key genes and related pathways in childhood obesity. *Gene.* **830**, 146512.
56. Alves, M. A., Lamichhane, S., Dickens, A., McGlinchey, A., Ribeiro,

- H. C., Sen, P., Wei, F., Hyötyläinen, T., and Orešič, M. (2021) Systems biology approaches to study lipidomes in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 1866, 15885.
57. Shiralipour, A., Khorsand, B., Jafari, L., Salehi, M., Kazemi, M., Zahiri, J., Jajarmi, V., and Kazemi, B. (2022) Identifying Key Lysosome-Related Genes Associated with Drug-Resistant Breast Cancer Using Computational and Systems Biology Approach. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR.* 21, e130342.
58. Shahnazari, M., Afshar, S., Emami, M. H., Amini, R., and Jalali, A. (2023) Novel biomarkers for neoplastic progression from ulcerative colitis to colorectal cancer: a systems biology approach. *Sci. Rep.* 13, 3413.
59. Platania, C. B. M., Leggio, G. M., Drago, F., Salomone, S., and Bucolo, C. (2018) Computational systems biology approach to identify novel pharmacological targets for diabetic retinopathy. *Biochem. Pharmacol.* 158, 13–26.
60. Mardinoglu, A., Boren, J., Smith, U., Uhlen, M., and Nielsen, J. (2018) Systems biology in hepatology: approaches and applications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 365–377.
61. Helmy, M., Smith, D., and Selvarajoo, K. (2020) Systems biology approaches integrated with artificial intelligence for optimized metabolic engineering. *Metab. Eng. Commun.* 11, e00149.
62. Dalio, R. J. D., Litholdo, C. G., Arena, G., Magalhães, D., and Machado, M. A. (2021) Contribution of Omics and Systems Biology to Plant Biotechnology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1346, 171–188.
63. Kijpornyongpan, T., Schwartz, A., Yaguchi, A., and Salvachúa, D. (2022) Systems biology-guided understanding of white-rot fungi for biotechnological applications: A review. *iScience.* 25, 104640.
64. Cao, X., Yu, W., Chen, Y., Yang, S., Zhao, Z. K., Nielsen, J., Luan, H., and Zhou, Y. J. (2023) Engineering yeast for high-level production of diterpenoid sclareol. *Metab. Eng.* 75, 19–28.
65. Zhang, Y., Su, M., Qin, N., Nielsen, J., and Liu, Z. (2020) Expressing a cytosolic pyruvate dehydrogenase complex to increase free fatty acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Factories.* 19, 226.
66. Li, F., Chen, Y., Qi, Q., Wang, Y., Yuan, L., Huang, M., Elseman, I. E., Feizi, A., Kerkhoven, E. J., and Nielsen, J. (2022) Improving recombinant protein production by yeast through genome-scale modeling using proteome constraints. *Nat. Commun.* 13, 2969.
67. Di Bartolomeo, F., Malina, C., Campbell, K., Mormino, M., Fuchs, J., Vorontsov, E., Gustafsson, C. M., and Nielsen, J. (2020) Absolute yeast mitochondrial proteome quantification reveals trade-off between biosynthesis and energy generation during diauxic shift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 7524–7535.
68. Qin, N., Li, L., Ji, X., Pereira, R., Chen, Y., Yin, S., Li, C., Wan, X., Qiu, D., Jiang, J., Luo, H., Zhang, Y., Dong, G., Zhang, Y., Shi, S., Jessen, H. J., Xia, J., Chen, Y., Larsson, C., Tan, T., Liu, Z., and Nielsen, J. (2023) Flux regulation through glycolysis and respiration is balanced by inositol pyrophosphates in yeast. *Cell.* 186, 748-763.e15.
69. Xie, T., Chen, M., Nielsen, J., and Xia, J. (2022) Multi-omics analyses of the transition to the Crabtree effect in *S. cerevisiae* reveals a key role for the citric acid shuttle. *FEMS Yeast Res.* 22, foac030.
70. Xia, J., Sánchez, B. J., Chen, Y., Campbell, K., Kasvandik, S., and Nielsen, J. (2022) Proteome allocations change linearly with the specific growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* under glucose limitation. *Nat. Commun.* 13, 2819.
71. Zhang, Y., Su, M., Wang, Z., Nielsen, J., and Liu, Z. (2022) Rewiring regulation on respiro-fermentative metabolism relieved Crabtree effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Synth. Syst. Biotechnol.* 7, 1034–1043.
72. Zhang, Z., Wang, J., Wang, J., Wang, J., and Li, Y. (2020) Estimate of the sequenced proportion of the global prokaryotic genome. *Microbiome.* 8, 134.
73. Leitch, I. J., Kooij, P., Coker, T., Grigoriev, I. V., Nagy, L., Martin, F., Stajich, J., Dentinger, B., and Gaya, E. Fungal genomes: Exploring, understanding and utilising their diversity.
74. Marks, R. A., Hotaling, S., Frandsen, P. B., and VanBuren, R. (2021) Representation and participation across 20 years of plant genome sequencing. *Nat. Plants.* 7, 1571–1578.
75. Hotaling, S., Kelley, J. L., and Frandsen, P. B. (2021) Toward a genome sequence for every animal: Where are we now? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2109019118.
76. Sohn, S. B., Graf, A. B., Kim, T. Y., Gasser, B., Maurer, M., Ferrer, P., Mattanovich, D., and Lee, S. Y. (2010) Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for in silico analysis of heterologous protein production. *Biotechnol. J.* 5, 705–715.
77. Tomàs-Gamisans, M., Ferrer, P., and Albiol, J. (2016) Integration and Validation of the Genome-Scale Metabolic Models of *Pichia pastoris*: A Comprehensive Update of Protein Glycosylation Pathways, Lipid and Energy Metabolism. *PLoS ONE.* 11, e0148031.
78. Cuevas, D. A., Edirisinghe, J., Henry, C. S., Overbeek, R., O’Connell, T. G., and Edwards, R. A. (2016) From DNA to FBA: How to Build Your Own Genome-Scale Metabolic Model. *Front. Microbiol.* [online] <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00907> (Accessed March 20, 2023).
79. Palsson, B. Ø. (2006) *Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks*, 1st Ed., Cambridge University Press, 10.1017/CBO9780511790515.
80. Lakshmanan, M., Koh, G., Chung, B. K. S., and Lee, D.-Y. (2014) Software applications for flux balance analysis. *Brief. Bioinform.* 15, 108–122.
81. Simensen, V., Schulz, C., Karlsen, E., Bråtelund, S., Burgos, I., Thorfinnsdottir, L. B., Garcia-Calvo, L., Bruheim, P., and Almaas, E. (2022) Experimental determination of *Escherichia coli* biomass composition for constraint-based metabolic modeling. *PLOS ONE.* 17, e0262450
82. O’Brien, E. J., Monk, J. M., and Palsson, B. O. (2015) Using Genome-Scale Models to Predict Biological Capabilities. *Cell.* 161, 971–987
83. Nielsen, J. (2017) *Systems Biology of Metabolism: A Driver for Developing Personalized and Precision Medicine.* *Cell Metab.* 25, 572–579
84. Mulder, S., Hamidi, H., Kretzler, M., and Ju, W. (2018) An integrative systems biology approach for precision medicine in diabetic kidney disease. *Diabetes Obes. Metab.* 20 Suppl 3, 6–13
85. Lai, X., Schmitz, U., and Vera, J. (2022) The Role of MicroRNAs in Cancer Biology and Therapy from a Systems Biology Perspective. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1385, 1–22
86. Bispo, I. M. C., Granger, H. P., Almeida, P. P., Nishiyama, P. B., and de Freitas, L. M. (2022) Systems biology and OMIC data integration to understand gastrointestinal cancers. *World J. Clin. Oncol.* 13, 762–778

87. Jafarnejad, M., Sové, R. J., Danilova, L., Mirando, A. C., Zhang, Y., Yarchoan, M., Tran, P. T., Pandey, N. B., Fertig, E. J., and Popel, A. S. (2019) Mechanistically detailed systems biology modeling of the HGF/Met pathway in hepatocellular carcinoma. *NPJ Syst. Biol. Appl.* **5**, 29
88. Heinken, A., Hertel, J., Acharya, G., Ravcheev, D. A., Nyga, M., Okpala, O. E., Hogan, M., Magnúsdóttir, S., Martinelli, F., Nap, B., Preciat, G., Edirisinghe, J. N., Henry, C. S., Fleming, R. M. T., and Thiele, I. (2023) Genome-scale metabolic reconstruction of 7,302 human microorganisms for personalized medicine. *Nat. Biotechnol.* [10.1038/s41587-022-01628-0](https://doi.org/10.1038/s41587-022-01628-0).
89. Mendoza, S. N., Olivier, B. G., Molenaar, D., and Teusink, B. (2019) A systematic assessment of current genome-scale metabolic reconstruction tools. *Genome Biol.* **20**, 158.
90. Edirisinghe, J. N., Faria, J. P., Harris, N. L., Allen, B. H., and Henry, C. S. (2018) Reconstruction and Analysis of Central Metabolism in Microbes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* **1716**, 111–129.
91. Arkin, A. P., Cottingham, R. W., Henry, C. S., Harris, N. L., Stevens, R. L., Maslov, S., Dehal, P., Ware, D., Perez, F., Canon, S., Sneddon, M. W., Henderson, M. L., Riehl, W. J., Murphy-Olson, D., Chan, S. Y., Kamimura, R. T., Kumari, S., Drake, M. M., Brettin, T. S., Glass, E. M., Chivian, D., Gunter, D., Weston, D. J., Allen, B. H., Baumohl, J., Best, A. A., Bowen, B., Brenner, S. E., Bun, C. C., Chandonia, J.-M., Chia, J.-M., Colasanti, R., Conrad, N., Davis, J. J., Davison, B. H., DeJongh, M., Devoid, S., Dietrich, E., Dubchak, I., Edirisinghe, J. N., Fang, G., Faria, J. P., Frybarger, P. M., Gerlach, W., Gerstein, M., Greiner, A., Gurtowski, J., Haun, H. L., He, F., Jain, R., Joachimiak, M. P., Keegan, K. P., Kondo, S., Kumar, V., Land, M. L., Meyer, F., Mills, M., Novichkov, P. S., Oh, T., Olsen, G. J., Olson, R., Parrello, B., Pasternak, S., Pearson, E., Poon, S. S., Price, G. A., Ramakrishnan, S., Ranjan, P., Ronald, P. C., Schatz, M. C., Seaver, S. M. D., Shukla, M., Sutormin, R. A., Syed, M. H., Thomason, J., Tintle, N. L., Wang, D., Xia, F., Yoo, H., Yoo, S., and Yu, D. (2018) KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. *Nat. Biotechnol.* **36**, 566–569.



DR. JUAN PABLO PARDO VAZQUEZ
ORCID: 0000-0001-6108-9705

Médico Cirujano por la Facultad de Medicina de la UNAM. La Maestría y el Doctorado en Ciencias Biomédicas con especialidad en Bioquímica los obtuvo en la misma Facultad. Como profesor del curso de Bioquímica y Biología Molecular en la licenciatura de Médico Cirujano, considera que esta materia es fundamental para tener médicos con conocimientos científicos, con un entendimiento integral del funcionamiento del cuerpo del hombre. Considera que sin la Bioquímica, la diferencia entre médicos y chamanes se desvanece. A nivel de posgrado, ha participado en cursos tan interesantes y fundamentales como el de Bioquímica, que se imparte en la Facultad de Química, el de Cinética Enzimática Avanzada y el de Modelado Molecular. En cuanto a la investigación, le interesan los temas relacionados con la enzimología, la cinética enzimática, el control metabólico, la biología de sistemas, y la bioenergética.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 153-162

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Enfermedad de McArdle: efecto de creatina y coenzima Q₁₀ sobre la actividad de la glucógeno fosforilasa muscular.

McArdle disease: effect of creatine and coenzyme Q₁₀ on the muscle glycogen phosphorylase activity.

Vázquez-Memije, Martha Elisa^{1,2*}, Osorio-Martínez, Susana² y Ruano Calderón, Luis Angel³.

¹Centro de Diagnóstico en Metabolismo Energético y Medicina Mitocondrial,

²Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana,

Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

³Servicio de Neurología. Hospital General 450. Durango. Dgo.

*Correspondencia. Centro de Diagnóstico en Metabolismo Energético y Medicina Mitocondrial, S.C. Tlacoquemécatl 71. Del Valle, Benito Juárez, CDMX (México) C. P. 03100. Tel +52 55-5559-9124, mvmemije@hotmail.com.

Resumen

La enfermedad de McArdle es un trastorno metabólico común caracterizado por intolerancia grave al ejercicio, mialgia y calambres. A pesar del amplio conocimiento sobre las bases moleculares de la enfermedad de McArdle, pocos estudios han utilizado un enfoque bioquímico para explorar opciones de mejoría en la capacidad de ejercicio en estos pacientes. El objetivo de este estudio fue investigar si el uso de creatina y Coenzima Q10 tienen un efecto sobre la actividad de la glucógeno fosforilasa *a* y podrían mejorar el tratamiento de la enfermedad de McArdle. Se realizaron ensayos bioquímicos de la actividad de la glucógeno fosforilasa muscular para estudiar el efecto de la creatina y la coenzima Q10. Los resultados mostraron que ambos compuestos aumentaban la actividad de la miofosforilasa en un 30-35%. Los presentes datos *in vitro* y sobre la enzima aisladas apoyan la noción de que la suplementación con creatina y CoQ10 puede mejorar a los pacientes con enfermedad de McArdle.

Palabras clave: Enfermedad de McArdle, Fosforilasa, Creatina, Coenzima Q10

Abstract

McArdle disease is a common metabolic disorder characterized by severe exercise intolerance, myalgia and cramps. Despite our extensive knowledge of the molecular basis of McArdle disease, few studies have used a biochemical approach to explore options of improving exercise capacity in these patients. The aim of this study was to investigate whether the use of creatine and CoQ10 have an effect on the glycogen phosphorylase *a* activity and could improve the treatment of McArdle disease. Biochemical assays of muscle glycogen phosphorylase activity were performed to study the effect of creatine and coenzyme Q10. The results showed that both, compounds increased myophosphorylase activity by about 30-35%. The present data *in vitro* and on isolated enzyme support the notion that creatine and CoQ10 supplementation may improve patients with McArdle disease.

Keywords: McArdle disease, Phosphorylase, Creatine, Coenzyme Q10

Introducción

Las miopatías metabólicas son enfermedades que afectan principalmente al músculo esquelético. Constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas heredadas en la mayoría de los casos, en forma autosómica recesiva, y son debidas a una disminución o ausencia de la actividad de las enzimas participantes en las vías metabólicas productoras de energía. El resultado común para todas ellas es una disminución en la síntesis de ATP (1,2). Se clasifican en tres grandes grupos:

- Miopatías por alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos (glucogenosis).
- Miopatías por alteraciones en el metabolismo lipídico.
- Miopatías debidas a alteraciones en la función mitocondrial

Glucogenosis tipo V, déficit de miofosforilasa α , o Enfermedad de McArdle.

Es la glucogenosis muscular más frecuente y se hereda de forma autosómica recesiva. Es causada por defectos genéticos de la isoforma del músculo, conocida como glucógeno fosforilasa muscular (GPM, o miofosforilasa) (3). Se han descrito más de 100 mutaciones, además de polimorfismos, del gen PYGM localizado en el cromosoma 11q13 que codifica la miofosforilasa, lo cual bloquea la producción de ATP a partir de glucógeno en el músculo esquelético (4,5). La fosforilasa existe en dos formas, la forma fosforilada, llamada fosforilasa α , es la forma activa, mientras que la no fosforilada, llamada forma β , es la forma inactiva del músculo en reposo (6).

La deficiencia en la degradación del glucógeno por la fosforilasa produce severas limitaciones tanto en el metabolismo anaeróbico (producción de ATP por fosforilación a nivel de sustrato), como en el aeróbico (producción de ATP vía la fosforilación oxidativa). La enfermedad de McArdle se presenta única y exclusivamente como una miopatía.

La reacción principal para la movilización del glucógeno está catalizada por la miofosforilasa, esta enzima cataliza la fosforólisis del glucógeno, reacción en la que el Pi se utiliza para la ruptura del enlace glucosídico y producir glucosa-1-fosfato. La glucosa-1-fosfato, por acción de la fosfoglucomutasa se transforma en glucosa-6-fosfato para poder entrar a la vía glicolítica. La deficiencia de la glucógeno fosforilasa muscular produce alteraciones en el metabolismo del glucógeno que llevan a la acumulación del mismo en el músculo y a la manifestación clínica de la enfermedad de McArdle. Los síntomas aparecen en la adolescencia o juventud, siendo raros en la infancia. Es característica la intolerancia al ejercicio, con mialgias, calambres y rigidez muscular. Alrededor de un 50% de los casos presenta crisis de mioglobinuria o rhabdomiólisis tras el ejercicio intenso, y en la mitad de éstos puede desencadenarse un falla renal aguda (7). Es típico el llamado «fenómeno del segundo aire» o recuperación parcial tras el

reposo después de un episodio de intolerancia. Más del 90% de los casos presentan actividad de la creatina-fosfoquinasa (CPK) moderadamente elevada en periodos intercríticos y muy elevada tras las crisis (hasta 100 veces o más el valor normal). La prueba del ácido láctico con ejercicio e isquemia muestra una curva característicamente plana y discreto aumento del amonio. La electromiografía señala un patrón miopático o normal en periodos intercríticos. El diagnóstico se basa en la elevación en el contenido de glucógeno y la reducción de la actividad de la GP en la biopsia de tejido muscular (8-10). Hasta la fecha no existe un tratamiento específico disponible para esta situación metabólica, aunque se han intentado varios procedimientos. Sin embargo, se puede mejorar la calidad de vida de los pacientes con una dieta adecuada y controlando la actividad física (11). El uso de la creatina como un suplemento de forma oral para obtener un mayor rendimiento contráctil, así como su efecto sobre el metabolismo del músculo, es verdaderamente un tema de interés en la fisiología del ejercicio. La evidencia acumulada muestra que la ingesta de creatina en dosis altas a corto plazo, puede aumentar las reservas de creatina, principalmente en su forma no-fosforilada (12-14) y por tanto mejorar la capacidad del músculo para realizar el máximo ejercicio intermitente (12,15-18). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos que justifiquen la ingesta de la creatina para mejorar el desarrollo del músculo están poco explorados. Menos aún, se ha descrito un efecto directo de estos compuestos sobre la actividad de la miofosforilasa.

La creatina es una molécula biológica con un gran parecido a los aminoácidos. Su característica principal es que puede unirse con una molécula de fosfato inorgánico formando un enlace de alta energía. El producto formado es la fosfocreatina (PCr). La creatina y la PCr tienen un papel importante en la regulación y mantenimiento del ATP que se utiliza para la contracción muscular. Cuando el músculo se contrae, el ATP se consume y la creatina cinasa cataliza la refosforilación del ADP para formar ATP, usando PCr como reservorio de la fosforilación. Así, la PCr, por intermedio del ATP, constituye una reserva energética rápidamente utilizable por el músculo esquelético y otros tejidos, como por ejemplo el del cerebro (metabolismo anaeróbico). Sin embargo, la reserva de PCr no permite este gasto durante un largo período de tiempo. Este proceso de obtención de energía, pasados 10 segundos, da lugar a otros mecanismos, como la glucólisis y por último la respiración celular, que toma el relevo después de unos dos minutos hasta el final del ejercicio muscular. La coenzima Q10 (CoQ10, ubiquinona), un lípido con actividad redox, y antioxidante por excelencia se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial interna. Es un componente obligado en la cadena transportadora de electrones y está asociado con el proceso de fosforilación oxidativa. Tejidos con demandas elevadas de energía, como el corazón, el músculo esquelético y neuronas, suelen ser cultivadas con altas concentraciones de CoQ10. Además, es sabido que la concentración tisular de CoQ10 disminuye con la edad y el

estrés oxidativo. Todas estas observaciones han demostrado su papel bioenergético y son la base de la recomendación clínica para la aplicación de CoQ10 (19, 20). La CoQ₁₀ ha acumulado un gran interés e importancia como suplemento oral, debido a su función como un eficaz antioxidante en su forma reducida (ubiquinol-10). Protege a los fosfolípidos de la membrana, proteínas de la membrana mitocondrial y al DNA mitocondrial (DNAMt), del daño oxidativo producido por los radicales libres de oxígeno (21,22). Ubiquinol-10 es tan efectivo en prevenir daño oxidativo a lípidos como el alfa-tocoferol y es considerado ser el mejor antioxidante soluble en lípidos, en humanos. De hecho, se ha descrito que la suplementación con CoQ10 disminuye el estrés oxidativo y mejora el flujo sanguíneo en pacientes con dislipidemia moderada (23).

La administración de la CoQ10 ha sido muy útil en el tratamiento clínico de algunos pacientes con encefalopatía mitocondrial causada por mutaciones en el DNAMt (24,25). También se han observado grandes beneficios clínicos en ciertos pacientes con síntomas neurológicos causados por diabetes de origen materno y sordera (26). En estos pacientes, el tratamiento con la CoQ10 a largo plazo previene la deficiencia progresiva de la secreción de insulina, intolerancia al ejercicio y pérdida de la audición. La eficacia de la terapia con CoQ₁₀ sobre la encefalopatía mitocondrial y diabetes no ha sido del todo confirmada, por lo que es necesario realizar más trabajo en este campo.

Estudios recientes han demostrado efectos benéficos de la creatina y CoQ10 en el control de la enfermedad de McArdle (27). Sin embargo, no está descrito un efecto directo de estos compuestos sobre la actividad de la fosforilasa *a*. Además, es necesario subrayar que se han probado diferentes estrategias farmacológicas, nutricionales y actividad física, sin que hasta el momento exista una terapia eficaz para la enfermedad de McArdle. El objetivo de esta investigación fue explorar si la creatina y CoQ10 tenían un efecto estimulante sobre la actividad de la fosforilasa *a*, lo cual redundaría en un beneficio para el tratamiento de la enfermedad de McArdle.

Materiales y métodos.

Todos los reactivos utilizados fueron de la mejor calidad y pureza disponibles, principalmente de la marca Sigma-Aldrich. La glucógeno fosforilasa *a* de músculo de conejo, comercialmente preparada y cristalizada fue de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO.). Además, se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley para la obtención del tejido muscular utilizado en algunos experimentos. Los animales fueron mantenidos en las condiciones habituales del bioterio con acceso libre a comida y agua. Las biopsias musculares utilizadas en este estudio correspondieron a tres pacientes con sospecha de enfermedad de McArdle. Cada paciente firmó una carta de consentimiento informado de biopsia muscular, en la que autoriza se le tome la muestra.

Obtención de la fracción muscular. El músculo, tanto de rata como de la biopsia obtenida (10-20mg), fue incubado durante 1 minuto en β -Glicerol 2-fosfato 40mM, Fluoruro de sodio 40mM, EDTA 10mM y β -Mercaptoetanol 20mM, pH 6.8, y después homogeneizado en un homogeneizador tipo Potter- Elvehjem. El homogeneizado fue centrifugado 10 minutos a 7,500 xg, a 4°C en una centrífuga Beckman Avanti J-25 I. La pastilla obtenida fue descartada y el sobrenadante fue utilizado para los ensayos bioquímicos. Todos los procedimientos fueron realizados a 4°C

Actividad enzimática de la glucógeno fosforilasa. Para los estudios cinéticos, la enzima liofilizada fue solubilizada en EDTA 1mM, ditiotritol 10mM, β -glicerol fosfato 10 mM, pH 6.8, para lograr una concentración de 0.7 μ g fosforilasa *a*/ μ l. Esta preparación fue utilizada dentro de las 24 hrs de la solubilización de la enzima. La reacción fue iniciada por la adición de 7 μ g de fosforilasa *a* o 80-100 μ g de proteína muscular a una mezcla de incubación que contenía Na₂HPO₄ 20 mM pH 7.2, MgCl₂ 2 mM, NADP1 mM, glucógeno 0.1%, 3 unidades de fosfoglucomutasa y 5 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Tiempo de incubación 1 min a 35°C. En la primera fase del ensayo, el glucógeno es degradado por la fosforilasa a glucosa 1-fosfato que es convertido por la enzima fosfoglucomutasa a glucosa 6-fosfato. La segunda parte del ensayo convierte glucosa 6-fosfato a fosfoglucono- δ -lactona, en una reacción acoplada a la reducción del NADP a NADPH el cual es monitoreado a 340nm contra un blanco apropiado. La actividad de la glucógeno fosforilasa *a* está expresada en nmoles por minuto por miligramo de proteína.

Síntesis de ATP. La síntesis del ATP fue determinada por un método espectrofotométrico, previamente descrito (28). En breve, las mitocondrias recién obtenidas (250–350 μ g proteína) fueron incubadas en Tris-HCl 20mM, sacarosa 150mM, ADP 1mM, fosfato 20mM, MgCl₂ 5mM, diadenosina pentafofosfato 100 μ M, glucosa 10mM, 30 unidades de hexocinasa, y succinato 50mM, (pH 7.5) a 37°C en viales y con agitación vigorosa para asegurar la máxima oxigenación. La reacción fue iniciada con la adición del sustrato, succinato 50 mM y detenida después de 10 min con EDTA 25mM + cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona(CCCP)2 μ M. La glucosa 6-fosfato sintetizada fue oxidada por NADP en presencia de 30 unidades de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. La formación de NADPH fue registrada a 340 nm.

La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Todos los datos están expresados como promedio \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue realizado con el software estadístico SPSS. La significancia estadística fue evaluada utilizando la prueba one-way ANOVA. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a una $p < 0.05$.

Resultados

En primer lugar, se estudió el efecto de diferentes

concentraciones de creatina sobre la actividad de la glucógeno fosforilasa de músculo de rata. La figura 1A muestra que la enzima fue sensible a la mayoría de las concentraciones de creatina utilizadas, las cuales estuvieron en un rango de 10 a 500 μM , con un incremento en la actividad de 20-35%.

Los resultados obtenidos en presencia de la CoQ10 fueron

muy similares. Se observó un incremento en la actividad a todas las concentraciones ensayadas pero la más elevada (35%) se consiguió a 80 μM y 250 μM . Las concentraciones probadas de la CoQ10 estuvieron en un rango de 20 μM -500 μM y la miofosforilasa siempre mostró dos picos de máxima actividad, a 80 μM y 250 μM (figura 1B).

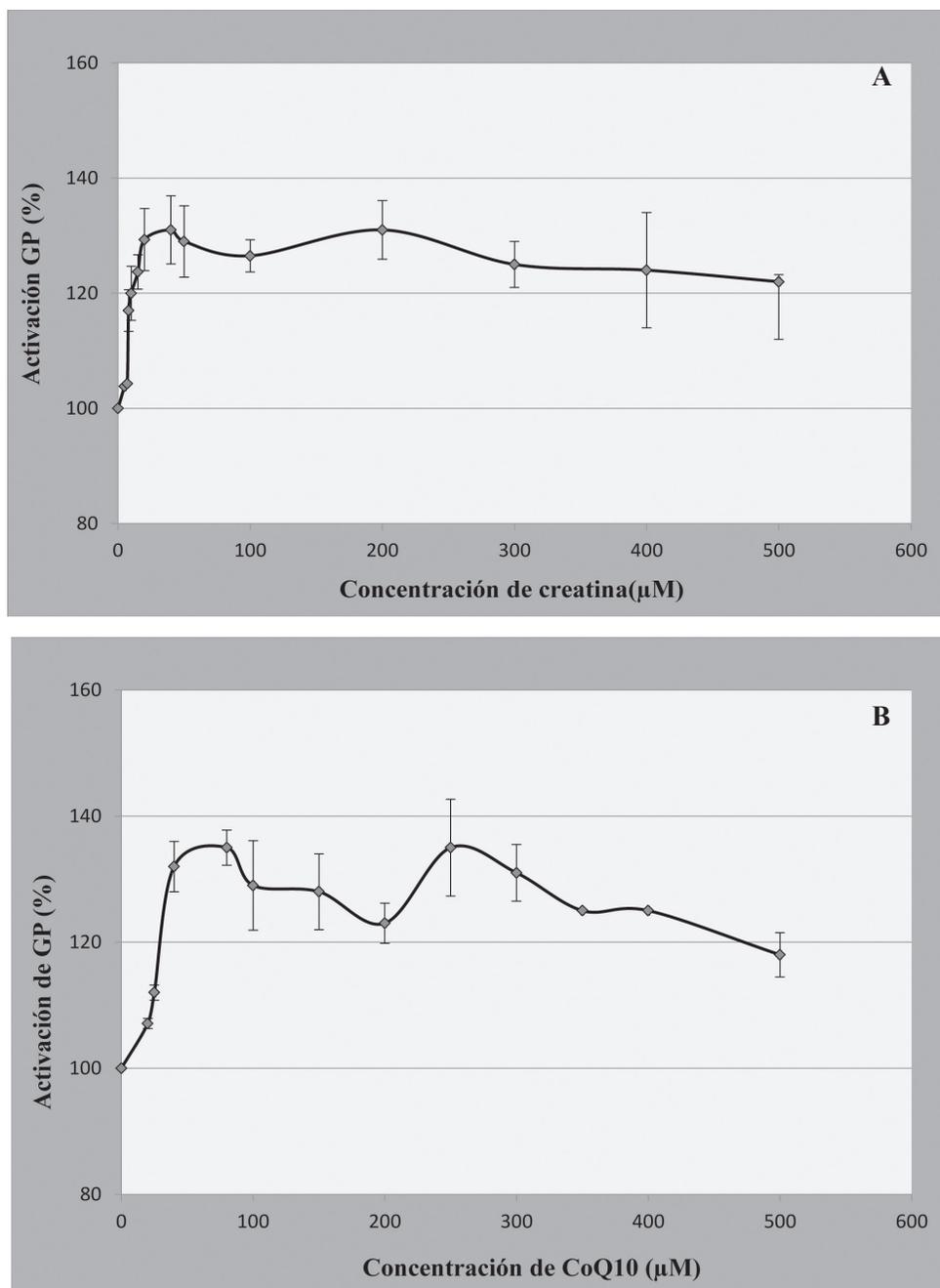


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de creatina y CoQ10 sobre la actividad de la glucógeno fosforilasa (GP) de músculo de rata. La actividad enzimática de la fosforilasa se evaluó por un método espectrofotométrico en una reacción acoplada, en la que se determinó la formación de NADPH a 340nm. (A), creatina; (B), CoQ10

La fosforilasa α aislada de músculo de conejo, también fue estimulada por la creatina. La estimulación máxima (30%) fue observada con 75 μM de creatina (figura 2A) una

concentración mayor que aquella requerida para estimular la GP de músculo esquelético de rata.

En presencia de CoQ10, la actividad de la fosforilasa *a* fue incrementada 30% a una concentración de 40 μM de la CoQ10 (figura 2B) en presencia de la CoQ10 la actividad de la fosforilasa *a* fue incrementada 30% a una concentración

de 40 μM de la CoQ10 (Figura 2B). Esta enzima aislada, también mostró dos picos de activación por CoQ10 pero a concentraciones menores (40 μM y 150 μM) que aquéllas requeridas para activar la GP de músculo de rata.

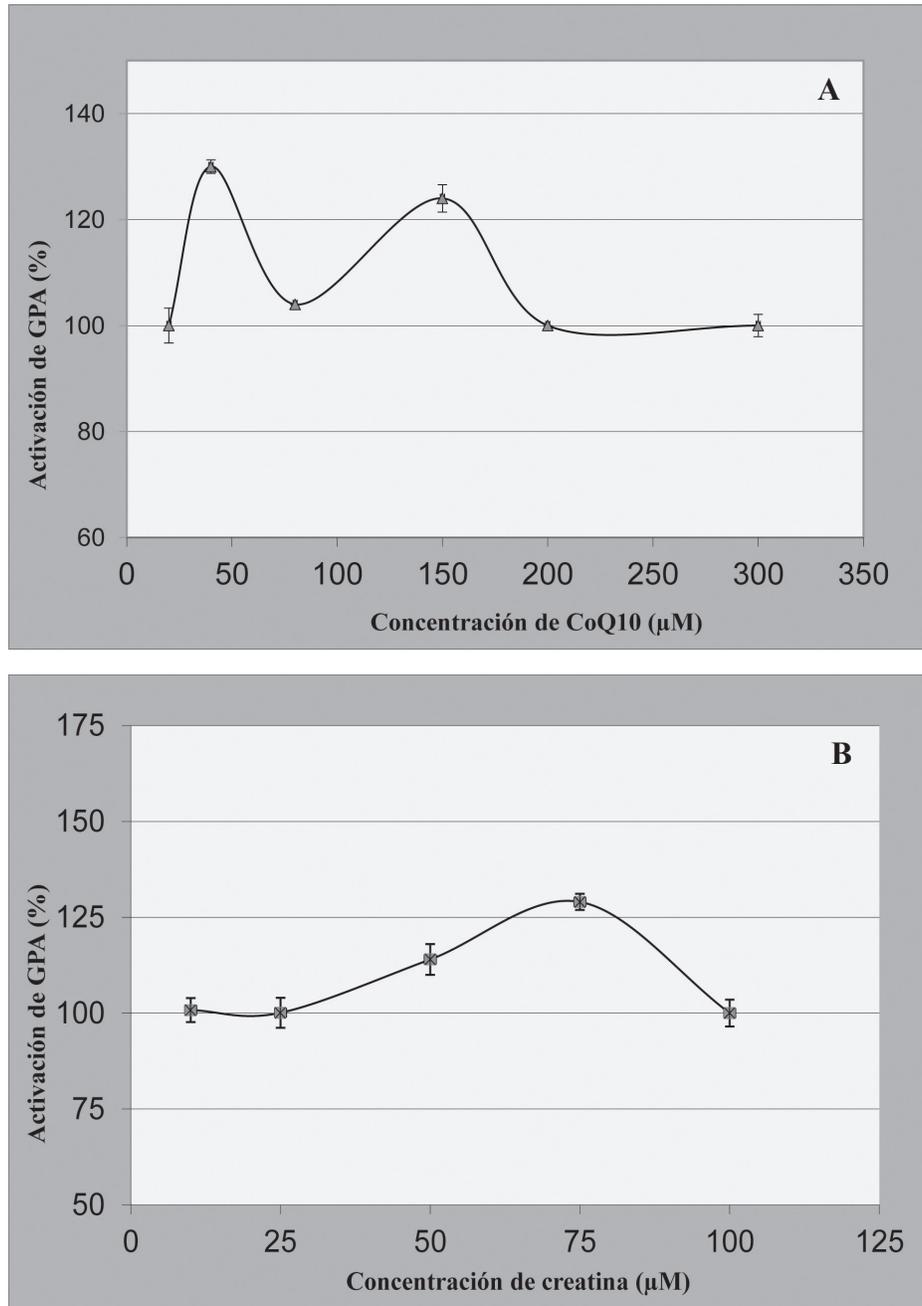


Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones de creatina y CoQ10 sobre la actividad de la fosforilasa *a*, aislada. (A), creatina; (B), CoQ10.

Ya que era de nuestro interés saber si el efecto estimulante de creatina y CoQ10 observado para la GPM, podría reproducirse en la fosforilación oxidativa, se determinó la velocidad de síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de músculo esquelético en presencia de diferentes concentraciones de

creatina y CoQ10. Nuestros resultados mostraron que ni la creatina ni la CoQ10 tuvieron un efecto estimulante sobre la producción de ATP a ninguna de las concentraciones probadas (Tabla I).

Tabla I. Efecto de creatina y Co Q10 sobre la velocidad de síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de músculo esquelético (nmoles/min/mg proteína).

Control	21.43 ± 2.57	Control	22.5 ± 2.41
Creatina 75 µM	23.15 ± 2.08	CoQ10 80 µM	16.23 ± 2.43
Creatina 150 µM	22.28 ± 2.67	CoQ10 160 µM	16.55 ± 1.65
Creatina 200 µM	13.96 ± 1.81	CoQ10 260 µM	23.14 ± 3.46
-----	-----	CoQ10 320 µM	7.28 ± 0.60

Con el propósito de investigar si la creatina y CoQ10 podrían mejorar la deficiencia de la fosforilasa muscular detectada en tres pacientes, la actividad enzimática de la fosforilasa α fue determinada en presencia de CoQ10 y creatina en biopsias de músculo esquelético sin tratamiento alguno. En la Tabla II, se describen las características clínicas de

los pacientes. Son dos mujeres (biopsias 1 y 3) y un varón (biopsia 2). Este último con una reducción en la actividad de la miofosforilasa del 81%. Las biopsias 1 y 3 tuvieron una reducción muy significativa en la actividad de la GPM, 85% y 90% respectivamente.

Tabla II. Características clínicas de tres pacientes con deficiencia de miofosforilasa

Paciente	Sexo	Edad (años)	Edad de inicio (años)	Intolerancia al ejercicio	Mialgia	Amiotrofia	CPK* (mg/dL)	Actividad residual de la PYGM (%)
1	F	36	1.5	+++	++	++	Normal	15
2	M	36	31	+++	++	no	333	19
3	F	44	24	+++	+++	++	35	10

++ moderado, +++ severo

* Normal hasta 170 mg/dL

La CoQ10, a todas las concentraciones probadas, tuvo un efecto estimulante, que en algunos casos duplicó la actividad de la GPM en las biopsias de pacientes con la enfermedad de McArdle (Figura 3B) y que correspondieron a los pacientes 1 y 2, los cuales tuvieron una actividad residual de la

miofosforilasa del 15 y 19%, respectivamente. La biopsia del paciente con la menor actividad de GPM (de sólo 10%), no tuvo respuesta a la adición de la CoQ10. La creatina tuvo efecto estimulador, únicamente en la biopsia control a una concentración de 100 µM (figura 3A).

La actividad de la GPM de las biopsias de pacientes con la enfermedad de McArdle no fue estimulada por la presencia de creatina.

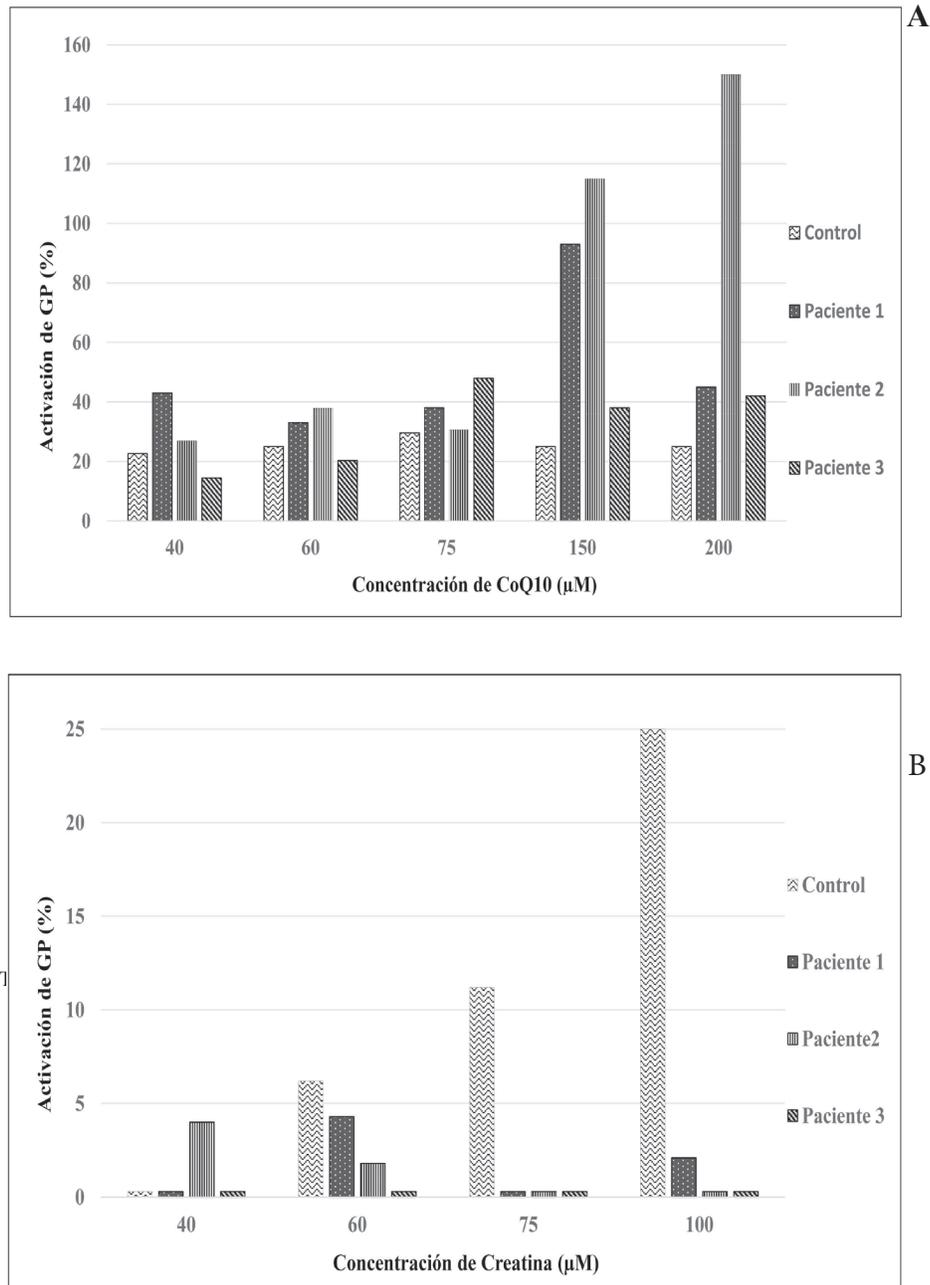


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de creatina y CoQ10 sobre la actividad de la fosforilasa a en biopsias musculares de pacientes con enfermedad de McArdle. (A), creatina; (B), CoQ10.

Discusión

Hasta donde sabemos, este trabajo es el primero en investigar el efecto directo de la creatina y CoQ10 sobre la actividad de la fosforilasa a. Nuestros resultados *in vitro* indican que ambos, la creatina y CoQ10 fueron eficaces en estimular la actividad de la glucógeno fosforilasa muscular. Este dato es

compatible con la mejoría observada en algunos pacientes con la enfermedad de McArdle, suplementados con creatina (27), así como con la referencia de que la creatina estimula la velocidad de síntesis de actina y miosina en el músculo (29). Los datos obtenidos en esta investigación señalan que la creatina tiene un efecto específico sobre la glucógeno fosforilasa muscular, ya que fue capaz de estimular tanto

a la GP de músculo esquelético, como a la GPM aislada y purificada comercialmente y no así, la síntesis del ATP que no fue afectada por la creatina ni por la CoQ10. Por otro lado, la actividad de la GPM determinada en biopsias de pacientes con la enfermedad de McArdle y en presencia de creatina, no fue estimulada. Estos resultados sugieren que la creatina de alguna forma mejora la interacción de la enzima con su sustrato, ya que cuando hay deficiencia de la glucógeno fosforilasa muscular, la interrelación de ésta con su sustrato sería muy poco probable. De hecho, aquellos autores que describen mejoría, con la suplementación oral de creatina, en pacientes con la enfermedad de McArdle, al mismo tiempo señalan que no todos los pacientes tienen respuesta favorable al consumo de creatina (27). La mayoría de los pacientes con enfermedad de McArdle tienen mutaciones sin sentido en el gen PYGM (4) y supuestamente no tienen músculo fosforilasa. ¿Cómo entonces, la creatina podría activar a una enzima faltante? La situación podría ser diferente en aquellos pacientes que tienen una actividad residual de la fosforilasa, en quienes incluso, una pequeña estimulación de la actividad residual podría ser benéfico para ellos (30). No fue el caso de las biopsias analizadas en esta investigación. La creatina no estimuló la actividad de la fosforilasa *a*, en las biopsias de pacientes con la enfermedad de McArdle debido probablemente a la baja actividad residual de la GPM detectada en estas biopsias, y a que los ensayos fueron realizados *in vitro*.

Algunos estudios *in vitro* han demostrado que la creatina puede ser utilizada para incrementar la velocidad de respiración en las mitocondrias de músculo esquelético (31) y en fibras musculares cardíacas (32). La función de la creatina como un aceptor del ATP mitocondrial ha sido discutido previamente (31,33). Así, el efecto de la creatina puede involucrar otros factores como, optimización de la conservación de energía, estimulación de la respiración mitocondrial, o estabilización de la creatina cinasa mitocondrial.

La CoQ10 es vital para la apropiada transferencia de electrones dentro de la cadena respiratoria mitocondrial cuya función principal es la producción de ATP. Desde su descubrimiento, la CoQ10 ha sido una de las moléculas más discutidas. El interés por determinar su verdadero valor como suplemento bioenergético en la contracción muscular, como antioxidante, o en el proceso inflamatorio como protector muscular en relación con el ejercicio, ha sido estudiado en diferentes niveles de población, en cuanto a edad, condiciones de salud, etc.

La literatura está saturada de reportes sobre la efectividad de la CoQ10 para el tratamiento de un rango muy extenso de enfermedades. Está ampliamente disponible sin receta como suplemento dietético y es recomendado tanto por médicos de atención primaria como por especialistas. Enfermedades como las neurodegenerativas, la fibromialgia, la migraña, la diabetes, el cáncer, las enfermedades mitocondriales, las enfermedades musculares y la insuficiencia cardíaca se asocian con niveles reducidos de CoQ10 (34-38). Se han realizado muchos estudios con la tesis de que aumentar los niveles

sistémicos de CoQ10 permitirá el adecuado funcionamiento de los procesos que requieren CoQ10 (34-36).

El impacto de la CoQ10 en la prevención de lesiones musculares radica presuntamente en su poder antioxidante y antiinflamatorio, su acción protectora sobre las mitocondrias y el DNAm; y su efecto modificador sobre la expresión de genes (39). La CoQ10 también estabiliza la estructura de los fosfolípidos de las membranas celulares y protege las células del músculo esquelético (40). Por lo tanto, la suplementación de CoQ10 puede reducir la lesión muscular inducida por el ejercicio al aumentar la concentración de CoQ10 en las membranas de las células musculares. Además, la suplementación con CoQ10 puede funcionar sinérgicamente con otras moléculas que ayudan a prevenir o restaurar el tejido tras el estrés producido por el ejercicio. Este es el caso de la creatina en el metabolismo energético y la restauración de tejidos (41,42), el ácido graso omega-3 en su actividad antioxidante y moduladora celular (43,44), o la curcumina por su actividad antiinflamatoria y antioxidante específica (45,46).

Con base en la revisión de muchos estudios, se puede inferir que el uso de CoQ10 parece ofrecer un buen perfil en el control de un patrón oxidativo con una cierta actividad antiinflamatoria a nivel celular, en respuesta al ejercicio en las diversas poblaciones estudiadas.

Se necesita más trabajo de investigación para determinar los efectos a largo plazo de la suplementación con creatina en pacientes con la enfermedad de McArdle, mientras que la CoQ10 ha sido más ampliamente estudiada y aceptada como un compuesto que aumenta la energía en sujetos sanos, en pacientes con miopatías metabólicas y en enfermedades mitocondriales.

Conclusiones

La creatina y CoQ10, utilizadas ampliamente en la clínica como coadyuvantes para el control de algunas distrofias musculares y de la enfermedad de McArdle, sí tienen un efecto estimulante directo sobre la Vmax de la glucógeno fosforilasa aislada y en músculo de rata.

La respuesta de la enzima en las biopsias musculares a las diferentes concentraciones de creatina y CoQ10, parece estar relacionada con la actividad basal que presentaba la fosforilasa. A mayor deficiencia se observó una mejor respuesta, especialmente a la Co Q10.

Referencias

- Berardo, A., DiMauro, S., and Hirano M. (2010) A diagnostic algorithm for metabolic myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* **10**, 118-126.
- Adler, M., and Shieh, P.B. (2015) Metabolic Myopathies. *Semin. Neurol.* **35**, 385-397.
- Leite, A., Oliveira, N., Rocha, M. (2012) McArdle disease: A case report and review. *Int Med Case Rep. J.* **5**, 1-4.
- Nogales-Gadea, G., Brull, A., Santalla, A., Andreu, A.L., Arenas, J.,

- Martín, M.A., and Lucía, A. de Luna. (2015) McArdle disease: Update of Reported Mutations and Polymorphisms in the PYGM gene. *Hum. Mutat.* **36**, 669-678.
5. Llaveró, A., Luque-Montoro, M., Gálvez, P., Lacerda, H. M., Parada, L.A., and Zugaza, J.L. (2019) McArdle Disease: New Insights Into Its Underlying Molecular Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **20**,5919-5933.
 6. Johnson, L.N. (1992) Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J.* **6**, 2274-2282
 7. Brady, S., Godfrey, R., Scalco, R.S., and Quinlivan, R.M. (2014) Emotionally-intense situations can result in rhabdomyolysis in McArdle disease. *BMJ Case Rep.* Oct 7, 1-3
 8. Cortés, R., Kleinstaub, K., Vargas, C.P., and Avaria, M.A. (2018) Metabolic Myopathies. *Rev. Med. Clin. Condes.* **29**, 622-635.
 9. Joshi, P.R., Deschauer, M., Zierz, S. (2020) McArdle Disease: Clinical, Biochemical, Histological and Molecular Genetic Analysis of 60 patients. *Biomedicines.* **8**, 33-43.
 10. López, A., Baños, I., García-Están, J., García, B., Pérez, J., and Salmerón, P. (2001) Enfermedad de McArdle: descripción de cuatro hermanos con déficit de miofosforilasa. *An. Med. Interna.* **18**, 136-138.
 11. Lucía, A., Nogales-Gadea, G., Pérez, M., Martín, M.A., Andreu, A.L., and Arenas J. (2008) McArdle disease: What do neurologists need to know? *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **4**:568-577.
 12. Casey, A., Constantin-Theodosiu, D., Howell, S., Hultman, E., and Greenhaff, P.L. (1996) Creatine ingestion favorably affects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. *Am. J. Physiol.* **271**, E31-E37.
 13. Greenhaff, P.L., Bodin, K., Soderlund, K., and Hultman, E. (1994) Effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatine resynthesis. *Am. J. Physiol.* **266**, E725-E730.
 14. Harris, R.C., Soderlund, K., and Hultman, E. (1992) Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin. Sci.(Lond)* **83**, 367-374.
 15. Balsom, P.D., Soderlund, K., Sjodin, K.B., and Ekblom, B. (1995) Skeletal muscle metabolism during short duration high-intensity exercise: influence of creatine supplementation. *Acta Physiol. Scand.* **154**, 303-310.
 16. Birch, R., Noble, D., and Greenhaff, P.L. (1994) The influence of dietary creatine supplementation on performance during repeated bouts of maximal isokinetic cycling in man. *Eur. J. Appl. Physiol.* **69**, 268-270.
 17. Tarnopolsky, M., Zimmer, A., Paikin, J., Safdar, A., Aboud, A., et al. (2007) Creatine monohydrate and conjugated linoleic acid improve strength and body composition following resistance exercise in older adults. *PLoS ONE.* **2**, e991- e1001.
 18. Bogdanis, G.C., Nevill, M.E., Aphas, G., Stavrinou, P.S., Jenkins, D.G., Giannaki, C.D., Lakomy, H.K.A., and Williams, C. (2022) [Effects of oral creatine supplementation on power output during repeated treadmill sprinting.](#) *Nutrients* **14**, 1140-1153
 19. Lass, A., Kwong, L., and Sohal, R.S. (1999) Mitochondrial Coenzyme Q Content and Aging. *Biofactors* **9**, 199-205.
 20. Díaz-Casado, M.E., Quiles, J.L., Barriocanal-Casado, E., González-García, P., Battino, M., López, L.C. et al. (2019) The Paradox of Coenzyme Q10 in Aging. *Nutrients* **11**, 2221-2253.
 21. Frei, B., Kim, M.C., and Ames, B.N. (1990) Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4879-4883
 22. Bonakdar, R.A., and Guarneri, E. (2005) Coenzyme Q10. *Am. Fam. Physician* **72**, 1065-1070.
 23. Mthembu, S.X.H., Orlando, P., Silvestri, S., Ziqubu, K., Mazibuko-Mbeje, S.E., Mabhida, S.E. Nyambuya, T.M., Nkambule, B.B., Muller, C.J.F., Basson, A.K., Tiano, L. and Dlundia P.V. (2023) Impact of dyslipidemia in the development of cardiovascular complications: Delineating the potential therapeutic role of coenzyme Q10. *Biochimie* **204**, 33-40.
 24. Choi, C., Sunwoo, I.N. Kim, H.S., and Kim, D.I. (2000) Transient improvement of pyruvate metabolism after coenzyme Q therapy in Kearns-Sayre syndrome: MRS study. *Yonsei Med. J.* **41**, 676-679.
 25. Yang, X., and Fu, L.J. (2022) Familial mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome: Three case reports. *World J Clin Cases* **10**, 9945-9953.
 26. Suzuki, Y., Kadowaki, H., Atsumi, Y., Hosokawa, K., Katagiri, H., Kadowaki, T., et al. (1995) A case of diabetic amyotrophy associated with 3243 mitochondrial tRNALEU(UUR) mutation and successful therapy with coenzyme Q10. *Endocr. J.* **42**, 141-145.
 27. Vorgered, M., Grehl, T., Jager, M., Muller, K., Freitag, G., Patzold, T., Bruns, N., Fabian, K., Tegenthoff, M., Mortier, W., Luttmann, A., Zange, J., Malin, J.P. (2000) Creatine therapy in myophosphorylase deficiency (McArdle disease): a placebo-controlled crossover trial. *Arch. Neurol.* **57**,956-963.
 28. Vázquez-Memije, M.E., Rizza, T., Meschini, C., Nesti, C., Santorelli, F.M., and Carozzo, R. (2009) Cellular and functional analysis of four mutations located in the mitochondrial *atpase6* gene. *J. Cell. Biochem.* **106**, 878-886.
 29. Ingwall, J.S., Weiner, C.D., Morales, M.F., Davis, E., and Stockdale, F.E. (1974) Specificity of creatine in the control of muscle protein synthesis. *J. Cell Biol.* **62**,145-150.
 30. Vissing, J., Duno, M., Schwartz, M., and Haller, R.G. (2009) Splice mutations preserve myophosphorylase activity that ameliorates the phenotype in McArdle disease. *Brain* **132**, 1545-1552.
 31. Bessman, S.P., and Fonyo, A. (1966) The possible role of mitochondrial bound creatine kinase in regulation of mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**, 597-602.
 32. Field, M.L., Clark, J.F., Henderson, C., Seymour, A.M., and Radda, G.K. (1994) Alterations in the myocardial creatine kinase system during chronic anaemic hypoxia. *Cardiovasc. Res.* **28**, 86-91.
 33. Bessman, S.P., Geiger, P.J. (1981) Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* **211**, 448-452.
 34. Cordero, M.D., Santos-García, R., Bermejo-Jover, D., Sánchez-Domínguez, B., Jaramillo-Santos, M.R., and Bullón, P. (2012) Coenzyme Q10 in salivary cells correlate with blood cells in fibromyalgia: improvement in clinical and biochemical parameter after oral treatment. *Clin. Biochem.* **45**, 509-511.
 35. Jafari, M., Mousavi, S.M., Asgharzadeh, A., and Yazdani, N. (2018) Coenzyme Q10 in the treatment of heart failure: A systematic review of systematic reviews. *Indian Heart J.* **70**, S111-S117.
 36. Garrido-Maraver, J., Cordero, M.D., Oropesa-Ávila, M., Fernández-Vega, A., De la Mata, M., Delgado-Pavón, A., De Miguel, M., Pérez-Calero, C., Villanueva-Paz, M., Cotán, D., and Sánchez-Alcázar, J.A. (2014) Coenzyme Q10 therapy. *Mol Syndromol.* **5**, 187-97.

37. Du, J., Wang, T., Huang, P., Cui, S., Gao, C., Lin, Y., Fu, R., Shen, J., He, Y., Tan, Y., and Chen, S. (2018) Clinical correlates of decreased plasma coenzyme Q10 levels in patients with multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat. Disord.* **57**, 58-62.
38. Dahri, M., Tarighat-Esfanjani, A., Asghari-Jafarabadi, M., and Hashemilar, M. (2019) Oral coenzyme Q10 supplementation in patients with migraine: Effects on clinical features and inflammatory markers. *Nutr. Neurosci.* **22**, 607-615.
39. Linnane, A.W., Kopsidas, G., Zhang, C., Yarovaya, N., Kovalenko, S., Papakostopoulos, P., Eastwood, H., Graves, S., and Richardson, M. (2002) Cellular Redox Activity of Coenzyme Q10: Effect of CoQ10 Supplementation on Human Skeletal Muscle. *Free Radic. Res.* **36**, 445-453.
40. Bello, R.I., Gómez-Díaz, C., Burón, M.I., Alcaín, F.J., Navas, P., and Villalba, J.M. (2005) Enhanced anti-oxidant protection of liver membranes in long-lived rats fed on a coenzyme Q10-supplemented diet. *Exp. Gerontol.* **40**, 694-706.
41. Ahmed, M., Anderson, S.D., and Schofield, R.S. (2011) Coenzyme Q10 and creatine in heart failure: Micronutrients, macrobenefit? *Clin. Cardiol.* **34**, 196-197.
42. Guescini, M., Tiano, L., Genova, M.L., Polidori, E., Silvestri, S., Orlando, P., Fimognari, C., Calcabrini, C., Stocchi, V., and Sestili, P. (2017) The Combination of Physical Exercise with Muscle-Directed Antioxidants to Counteract Sarcopenia: A Biomedical Rationale for Pleiotropic Treatment with Creatine and Coenzyme Q10. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**:Artículo ID 7083049.
43. Mori, T.A., Burke, V., Puddey, I., Irish, A., Cowpland, C.A., Beilin, L., Dogra, G., Watts, G.F. (2009) The effects of omega-3 fatty acids and coenzyme Q10 on blood pressure and heart rate in chronic kidney disease: A randomized controlled trial. *J. Hypertens.* **27**, 1863-1872.
44. Kucharská, J., Poništ, S., Vancová, O., Gvozdjáková, A., Uličná, O., Slovák, L., Taghdisiesfejr, M., and Bauerová, K. (2021) Treatment With Coenzyme Q10, omega-3-Polyunsaturated Fatty Acids and Their Combination Improved Bioenergetics and Levels of Coenzyme Q9 and Q10 in Skeletal Muscle Mitochondria in Experimental Model of Arthritis. *Physiol. Res.* **70**, 723-733.



MARTHA ELISA VÁZQUEZ MEMIJE
ORCID: 0000-0003-3774-7012

Investigadora Biomédica. Química Farmacéutica Bióloga, egresada de la facultad de Química de la UNAM, con Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Miembro de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, de la Sociedad Mexicana de Biología del desarrollo y del Sistema Nacional de Investigadores.

Estancias de investigación realizadas en: Departamento de Neurología, Facultad de Medicina de la Universidad de Columbia, Nueva York, 1992-1994; Hospital Pediátrico “Bambino Gesù”, de Roma, Italia, periódicamente durante los años 1999 al 2008.

Adscrita, durante 35 años, en la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Trabajo de investigación desarrollado en el área de la bioenergética, estudiando la funcionalidad de las mitocondrias en diferentes condiciones fisiológicas tales como, diferenciación celular, envejecimiento y estrés oxidativo.

Los resultados del trabajo de investigación han sido publicados en revistas internacionales de gran impacto, reflejado en más de 1,000 citas a sus publicaciones. Cinco de sus trabajos forman parte de la gran lista de referencias citadas en la base de datos del Genoma MITOCONDRIAL HUMANO

En el año 2009, funda el Centro de Diagnóstico en Metabolismo Energético y Medicina Mitocondria, asociación no lucrativa de un grupo de profesionales que ofrece servicios de apoyo para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el metabolismo energético y miopatías neuromusculares, basados en técnicas genéticas, bioquímicas y moleculares, donde actualmente labora.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 163-174

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Coevolución mito-nuclear del reconocimiento de promotores en mamífero.

Mito-nuclear coevolution of mammalian promoter recognition.

Zamudio-Ochoa, Angelica^{1*}

¹Department of Biochemistry, Thomas Jefferson University

*Correspondencia. Department of Biochemistry, Thomas Jefferson University, 1020 Locust St, Philadelphia, Pennsylvania 19107, USA, Tel. (215) 503 4426, angelica.zamudio-ochoa@jefferson.edu

Resumen

Las proteínas codificadas en el genoma nuclear que interactúan con productos del genoma mitocondrial evolucionan más rápidamente que otros genes. Esto es causado por la alta tasa de mutación del genoma mitocondrial, que presiona al DNA nuclear a adaptarse continuamente.

Durante la transcripción mitocondrial ocurren interacciones entre proteínas codificadas en el genoma nuclear y el genoma mitocondrial. Nuestro análisis de datos de RNA-seq muestra los promotores mitocondriales de más del 50% de los mamíferos. Se observa una gran diversidad de secuencias y se revela un modelo de evolución mito-nuclear casi inexplorado. Nuestro objetivo es entender las bases moleculares del reconocimiento especie-específico de la RNA Polimerasa mitocondrial (mtRNAP) y los dos factores de transcripción (TFAM y TFB2M) para entender sus repercusiones en la evolución mitonuclear y especiación.

Tanto la mtRNAP como TFB2M, pero no TFAM, muestran reconocimiento especie-específico. Interesantemente, la sustitución de solamente 3 posiciones en el promotor humano con las bases de *Sus scrofa* (cerdo) permite el reconocimiento del promotor por parte de la maquinaria transcripcional porcina. La especificidad también puede intercambiarse sustituyendo residuos específicos en la mtRNAP. Estos aminoácidos importantes para el reconocimiento son muy divergentes en mamífero, sugiriendo un posible mecanismo

Abstract

Nuclear-encoded proteins that interact with mitochondria-encoded products evolve faster than other genes. This is caused by the high mutation rate of the mitochondrial genome, which compels the nuclear genome to adapt rapidly. During mitochondrial transcription, interactions between mtDNA and nuclear-encoded proteins take place. Our analysis of RNA-seq data reveals the mitochondrial promoters of more than 50% of mammals, showing a large diversity of sequences and uncovering an almost unexplored model of mitonuclear coevolution. We study the molecular basis of the species-specific promoter recognition by the mitochondrial RNA polymerase (mtRNAP) and the mitochondrial transcription factors (TFAM and TFB2M) to understand its repercussion in mitonuclear coevolution and speciation.

Both mtRNAP and TFB2M, but not TFAM, have species-specific recognition. Remarkably, substitution of only 3 critical positions of the human promoter with the bases from the distantly related mammal *Sus scrofa* (swine) allowed for recognition of the mutant promoter by the porcine transcription machinery. Recognition can also be switched by substituting specific residues in mtRNAP. These key amino acids are divergent in mammalian species and correlate with the variation of the recognized bases, hinting at a possible mechanism of speciation. Previous reports of mtRNAP involvement in hybrid incompatibility are supported by our observations.

de especiación. Nuestras observaciones respaldan otros reportes de la participación de la mtRNAP en incompatibilidad de híbridos. Nuestros estudios sobre el mecanismo de reconocimiento del promotor revelan la plasticidad de la maquinaria transcripcional mitocondrial, la cual puede adaptarse rápidamente a cambios en el genoma mitocondrial sin perder su capacidad de iniciar la transcripción de forma específica en el promotor.

Palabras clave: mitocondria, transcripción, evolución, promotores, especiación.

Our studies in promoter recognition mechanism reveal the plasticity of the mitochondrial transcription machinery, which can rapidly adapt to changes in the mitochondrial genome without losing the ability to initiate transcription in a promoter-dependent manner.

Keywords: Mitochondria, transcription, evolution, promoters, speciation.

Coevolución mito-nuclear del reconocimiento de promotores en mamífero

En el genoma mitocondrial humano se codifican 13 proteínas, todas ellas son subunidades de los complejos respiratorios (OXPHOS, Figura 1). Las 79 subunidades restantes se codifican en el núcleo y son importadas a la mitocondria luego de su síntesis en el citosol. La formación de complejos provenientes de dos distintos genomas genera interacciones entre el genoma nuclear y el mitocondrial, ya que una mutación en alguna subunidad codificada en el DNA mitocondrial podría ser compensada por

una mutación en el DNA nuclear, y viceversa. Dado que la tasa de mutación del DNA mitocondrial suele ser hasta 20 veces más alta que la del núcleo (1), las proteínas de origen nuclear que interactúan con componentes de origen mitocondrial suelen tener tasas de evolución más altas que otras proteínas (2). A esta evolución conjunta de los dos genomas se le conoce como coevolución mito-nuclear.

Las interacciones mito-nucleares son especialmente relevantes en los procesos de especiación. La ruptura de interacciones coadaptadas entre los dos genomas puede causar incompatibilidades entre los componentes de los complejos mitocondriales, afectando

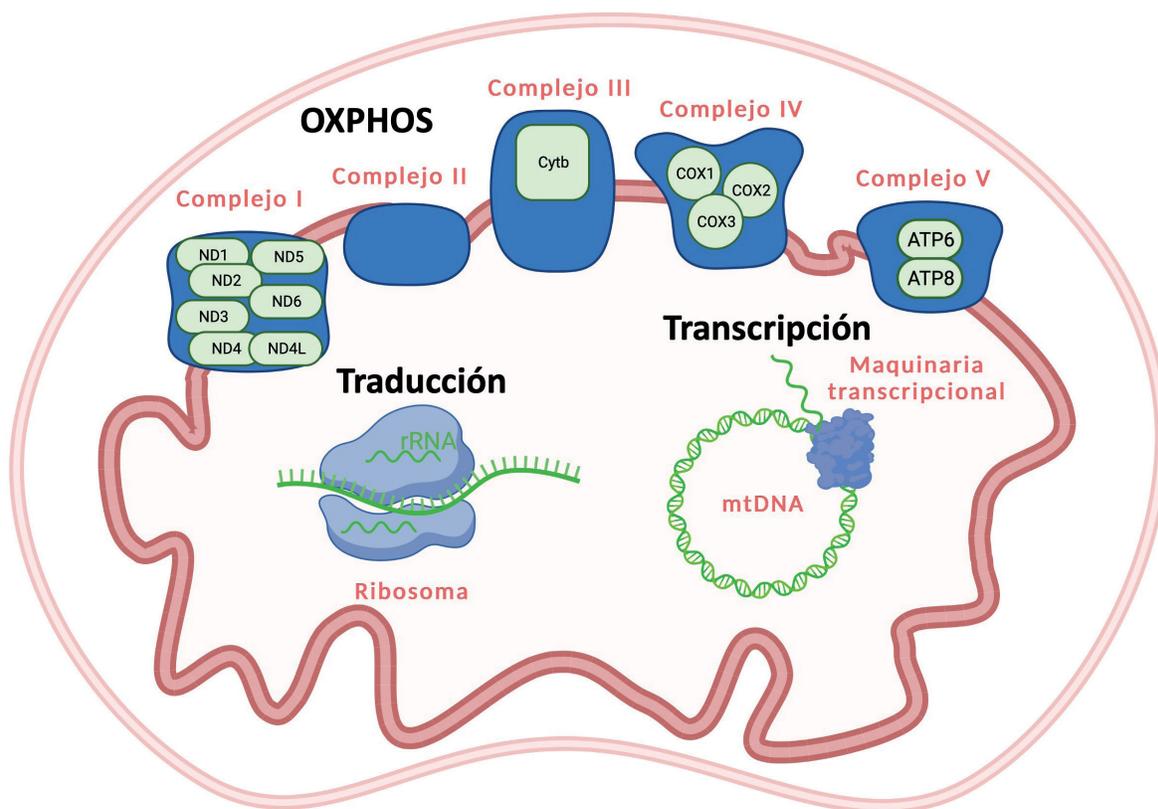


Figura 1. Interacciones mito-nucleares en la membrana interna (OXPHOS) y en la matriz mitocondrial (traducción y transcripción). En verde se muestran los componentes codificados en el genoma mitocondrial, en azul se representan las proteínas de origen nuclear. Creado con biorender.com

su función y potencialmente evitando las cruces entre individuos de poblaciones distintas, dando lugar a especiación (3, 4).

Además de las interacciones mitonucleares entre las proteínas de OXPHOS (Figura 1), también existen interacciones entre los ácidos nucleicos mitocondriales y las proteínas importadas. Los ribosomas mitocondriales son un ejemplo de interacciones RNA-proteína (Figura 1, traducción): mientras que los RNAs ribosomales se encuentran codificados en el genoma mitocondrial, todas las proteínas ribosomales deben de ser importadas. El proceso de transcripción mitocondrial es un ejemplo de interacción DNA-proteína (Figura 1, transcripción), en el que factores de origen nuclear deben de reconocer a los promotores, secuencias específicas en el DNA mitocondrial que indican el sitio de inicio de la transcripción. El estudio de las interacciones mitonucleares se ha enfocado principalmente en las interacciones proteína-proteína presentes en OXPHOS (5-8). Algunas investigaciones también han estudiado la coevolución de los ribosomas mitocondriales (9, 10), pero se han realizado muy pocos estudios acerca de las interacciones mito-nucleares en la transcripción mitocondrial (11).

El inicio de la transcripción mitocondrial

El genoma mitocondrial se transcribe a partir de dos promotores, uno en la cadena pesada (HSP, *Heavy Strand*

Promoter) y otro en la cadena ligera (LSP, *Light strand promoter*) (Figura 2A, B). Estos promotores son reconocidos por la RNA polimerasa mitocondrial (mtRNAP) y por dos factores de transcripción (TFAM y TFB2M). TFAM se asocia en la región que abarca entre las posiciones -17 a -39 río arriba del sitio de inicio de la transcripción (12). Luego de esta asociación, TFAM recluta a la RNA polimerasa a su sitio de reconocimiento. Por último, TFB2M se asocia al pre-complejo y participa en la desnaturalización del promotor (13). El complejo formado por estas tres proteínas ensambladas en el promotor se conoce como Complejo de Iniciación (IC, *Initiation Complex*) (Figura 2C).

Las tres proteínas del IC se encuentran muy conservadas entre los mamíferos, y son fáciles de identificar por medio de alineamientos. Este no es el caso de los promotores mitocondriales, los cuales son tan variables que deben de ser identificados experimentalmente.

El método más confiable para identificar promotores mitocondriales, y para estudiar muchos aspectos de la transcripción mitocondrial, es el ensayo de transcripción *in vitro*. En este ensayo se utiliza un fragmento de DNA que contiene, o se sospecha que contiene, el promotor mitocondrial seguido de la secuencia de DNA que será transcrita. Este DNA se incuba con las tres proteínas necesarias para iniciar la transcripción: mtRNAP, TFAM y TFB2M. Para marcar los

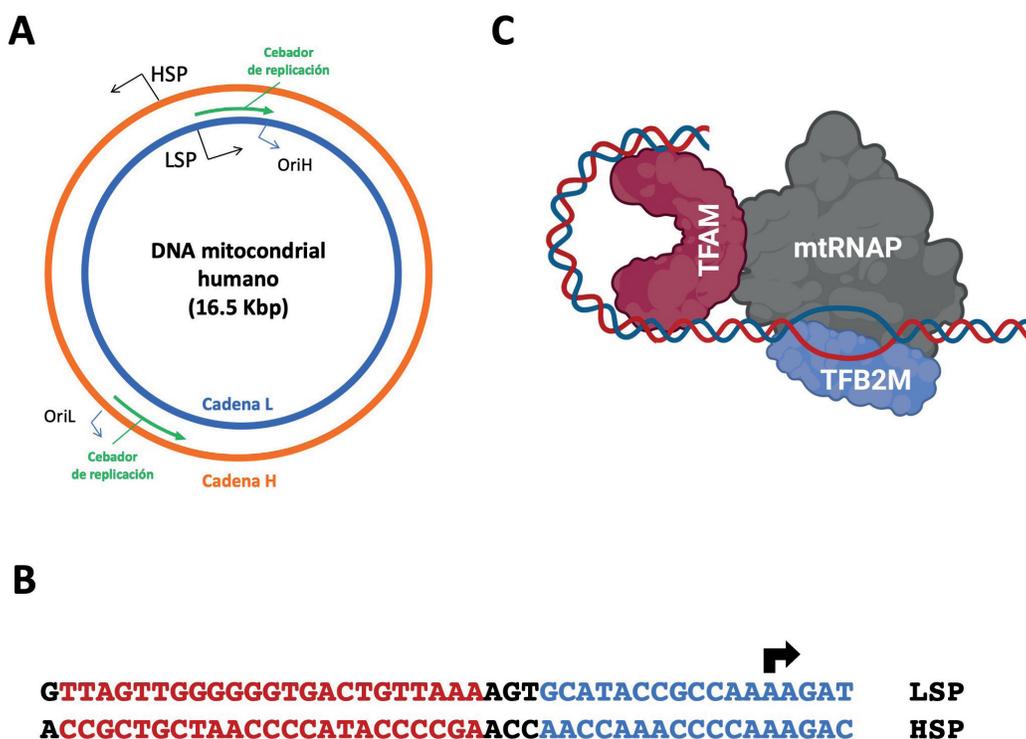


Figura 2. La transcripción mitocondrial en humano. A. El DNA mitocondrial humano cuenta con dos promotores (HSP y LSP) y dos orígenes de replicación. B. Comparación de las secuencias de LSP y HSP humanas. Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción. La región de unión de TFAM se indica con rojo, y la región de unión de la mtRNAP y TFB2M, con azul. C. Complejo de inicio de la transcripción mitocondrial. Creado con biorender.com

transcritos, se añaden nucleótidos radioactivos, los cuales serán incorporados en el RNA recién sintetizado. Luego de la incubación, los RNAs marcados se separan por electroforesis en un gel desnaturizante. Estos geles tienen una resolución hasta de un nucleótido, por lo que se puede separar, por ejemplo, un RNA de 19 nucleótidos de otro de 20.

El ensayo de transcripción *in vitro* requiere clonar, expresar y purificar las 3 proteínas de la especie cuyo promotor se desea identificar. Esto requiere una gran inversión de tiempo y recursos. Debido a esto, por casi 40 años solo se conocieron 2 pares de promotores mitocondriales: los de humano y los de ratón (14-16).

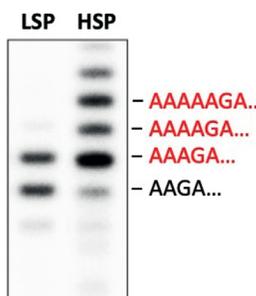
Identificación de promotores mitocondriales de mamífero

Para poder entender el mecanismo de reconocimiento del promotor, y su evolución en mamífero, era necesario conocer la secuencia de otros promotores mitocondriales. Una alternativa más rápida al ensayo de transcripción *in vitro* es la identificación del extremo 5' de los transcritos mitocondriales utilizando el método de RNA-seq. En esta técnica se purifica RNA del mamífero cuyo promotor se desea identificar. El RNA se fragmenta, y utilizando transcriptasa reversa se obtiene

cDNA. Los fragmentos de cDNA se ligan a adaptadores y la secuencia se obtiene a partir de secuenciación de nueva generación. Muchos estudios en mamífero han utilizado esta herramienta para distintos fines y los datos obtenidos son cargados en un sitio con acceso público (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>). Estos datos pueden utilizarse para identificar fragmentos de RNA cuyos extremos 5' mapeen a una misma base dentro de la región regulatoria del genoma mitocondrial (Figura 3A). Los datos de RNA-seq de humano corresponden exactamente a los datos obtenidos *in vitro* (Figura 3A, cuadro 1), así como los de ratón (14, 15) y cerdo (ver a continuación); lo cual indica que el análisis de datos de RNA-seq es una herramienta confiable para identificar promotores mitocondriales.

Los datos existentes de RNA-seq son suficientes para encontrar los promotores de 22 mamíferos pertenecientes a 12 ordenes diferentes (17). La búsqueda de promotores puede extenderse a otras especies utilizando las secuencias encontradas para realizar alineamientos con los genomas mitocondriales de otros mamíferos. De esta forma, es posible identificar los promotores mitocondriales de más del 50% de las especies de mamífero conocidas.

Cuadro 1. La transcripción reiterativa en humano. Cuando los promotores humanos se utilizan en la transcripción *in vitro*, se observan dos diferentes productos para LSP y cinco productos para HSP, todos ellos con un nucleótido de diferencia. Por muchos años se creyó que la mtRNAP no era muy específica para su sitio de inicio y comenzaba la transcripción en sitios alternativos. Sin embargo, por medio de mutaciones alrededor del sitio de inicio de la transcripción, descubrimos que el patrón de bandas observado se debe a que, en la fase de inicio de la transcripción, el RNA recién sintetizado “resbala”



hacia atrás sobre el DNA templado, y la mtRNAP añade nucleótidos extra en el extremo 3' (17). A este fenómeno se le conoce como “*slippage*” o transcripción reiterativa. Gracias al descubrimiento de este fenómeno, se pudo asignar correctamente el sitio de inicio de la transcripción en mitocondria de humano.

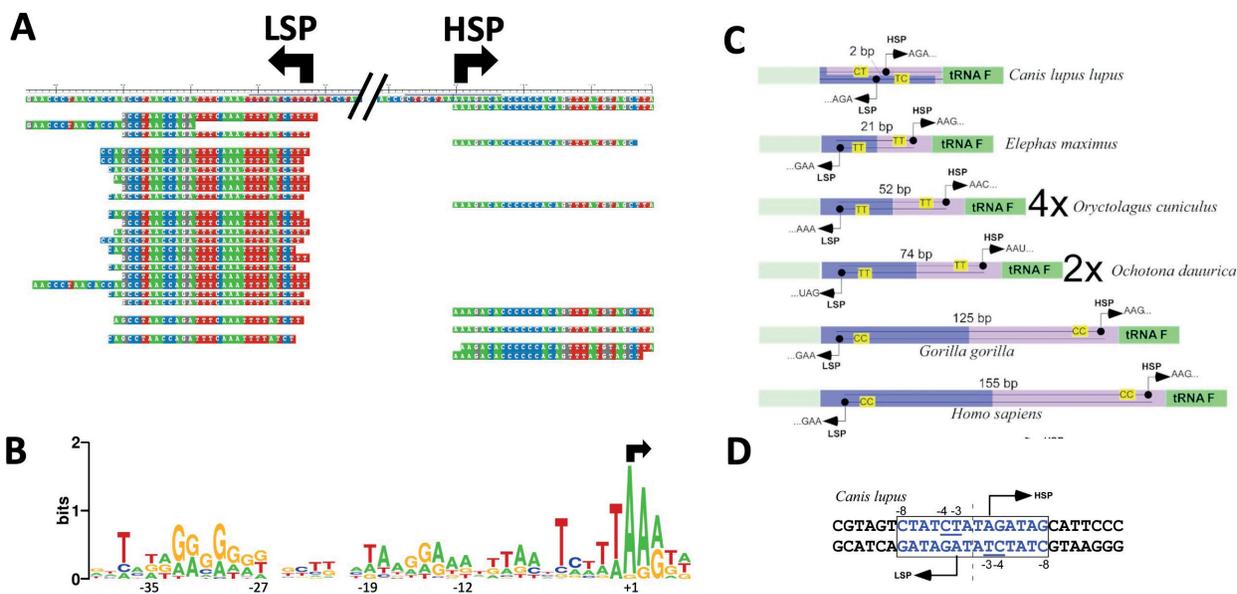


Figura 3. Diversidad de los promotores mitocondriales de mamífero. A. Identificación del extremo 5' de RNAs mitocondriales. Las secuencias de RNA-seq se alinean con la región de control del DNA mitocondrial para encontrar extremos 5' homogéneos. Se muestra el alineamiento de *Homo sapiens*. Nótese la variación de adeninas en el extremo 5' causado por la transcripción reiterativa. B. Conservación de los promotores mitocondriales en mamífero ilustrada con logos (weblogo.berkeley.edu). La flecha indica el primer nucleótido transcrito. C. Distancia entre LSP y HSP en distintos mamíferos. El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y la pica (*Ochotona dauurica*) tienen 2 y 4 repeticiones de bloques de promotores, respectivamente. D. Promotor palindrómico del perro. Tomado de (17).

Los promotores mitocondriales son muy diversos

Un análisis de los promotores mitocondriales de mamífero revela la alta diversidad que existe entre ellos (Figura 3B). Todas las mtRNAPs mitocondriales de mamífero comienzan la transcripción mitocondrial con una purina, generalmente adenina. Las posiciones +2 y +3 son también purinas y se encuentran muy conservadas. Las posiciones -1 a -5 suelen ser timinas o adeninas, probablemente porque tener enlaces con menor energía en esta región facilita la formación de la “burbuja” alrededor del sitio de inicio de la transcripción (ver Figura 2C). El resto de las bases del promotor, incluyendo la región de unión a TFAM, muestran muy poca conservación. Interesantemente, en algunas especies se observan varios pares de promotores (Figura 3C), como en el género Lagomorpha, que incluye conejos, liebres y picas y que contiene varios módulos de repetición. La distancia entre los dos promotores también es muy variable: el humano muestra la mayor distancia entre LSP y HSP (155 pb), mientras que el perro y todo el orden al que corresponde (Carnívora) mostró la separación más corta: 2 pb (Figura 3C, D). Interesantemente, el orden Carnívora también mostró un promotor palindrómico muy conservado entre todo el género (Figura 3D).

El fenómeno de transcripción reiterativa (ver cuadro 1), no está presente en todos los mamíferos, pero sí está conservado en todos los simios y monos del viejo mundo en ambos promotores (17). Algunos animales de otros ordenes también

muestran este fenómeno en alguno de los dos promotores, pero no en los dos. En general, el mecanismo de transcripción reiterativa no se encuentra muy conservado, y parece ser solamente una consecuencia de repeticiones de adeninas alrededor del sitio de inicio de la transcripción.

Las secuencias de los promotores mitocondriales en mamífero son muy variables y esto contrasta con la alta conservación de las proteínas que los reconocen (mtRNAP, TFAM y TFB2M). Por consiguiente, el mecanismo por el cual las proteínas del IC reconocen al promotor mitocondrial y al mismo tiempo son capaces de adaptarse a cambios rápidos en las secuencias reconocidas es un nuevo modelo de estudio de coevolución mito-nuclear.

El reconocimiento del promotor mitocondrial es especie-específico

Para estudiar la especificidad del reconocimiento por parte de las proteínas del IC hacia su promotor, se realizaron experimentos de transcripción *in vitro* probando cada uno estos factores con el promotor mitocondrial de otra especie. Para ello se utilizó el sistema de transcripción del cerdo común (*Sus scrofa*). *Sus scrofa* es un mamífero con un genoma mitocondrial y nuclear accesibles y anotados, cuyos promotores fueron encontrados utilizando datos de RNA-seq (17). Los promotores mitocondriales porcinos no muestran homología con los promotores humanos,

pero su RNAP comienza la transcripción con los mismos nucleótidos que la RNAP humana (AAG) (Figura 4A). Por lo tanto, la actividad catalítica de la RNAP no será afectada al trabajar con promotores híbridos, pero permitirá estudiar el reconocimiento especie-específico.

Para evaluar la especificidad de las proteínas del IC en la transcripción mitocondrial, cada una de las proteínas humanas se probó con el promotor porcino, y viceversa (Figura 4B). El único factor que no muestra una alta especificidad por el promotor de su especie es TFAM: la TFAM humana activó la

transcripción en el promotor porcino, y viceversa. La falta de especificidad especie-específica de TFAM por el promotor también se observó cuando la TFAM murina se utilizó en el promotor humano (18). Por el contrario, TFB2M y la mtRNAP no activan la transcripción en el sistema heterólogo de *Sus scrofa* (Figura 4B), y viceversa. Esto significa que la maquinaria transcripcional mitocondrial es capaz de discriminar entre promotores de distintas especies, y que este reconocimiento depende de la mtRNAP y de TFB2M.

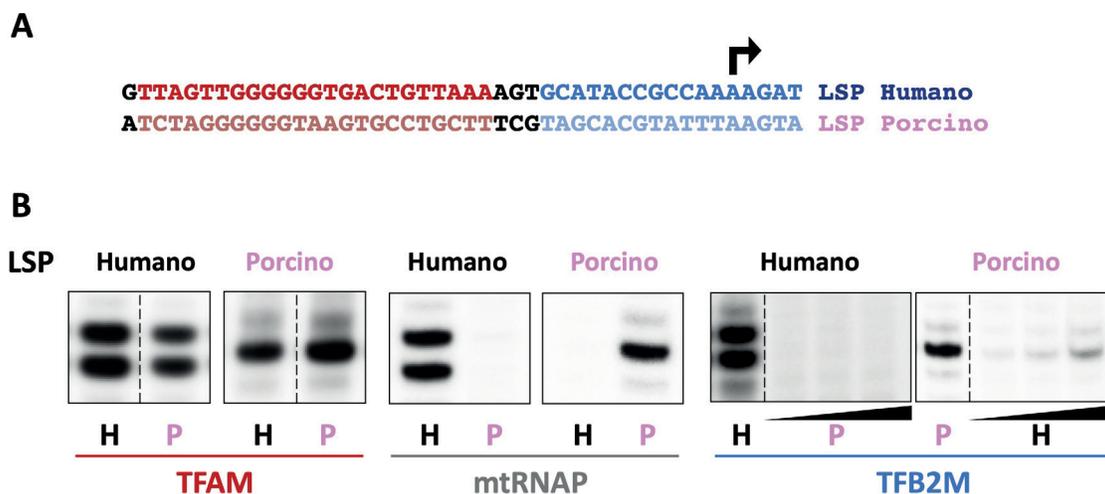


Figura 4. La mtRNAP y TFB2M tienen reconocimiento especie-específico. A. Comparación de la secuencia de LSP humano y porcino. La región de unión de TFAM se indica con rojo, y la región de unión de la mtRNAP y TFB2M, con azul. B. Transcripción heteróloga de humano y porcino. El ensayo de transcripción *in vitro* de cada promotor se realizó en presencia de las proteínas de su especie, excepto la proteína indicada (H, humano. P, porcino).

Mecanismo de reconocimiento del promotor mitocondrial

Como se observa en la estructura cristalográfica del IC, la mtRNAP y TFB2M contactan a los nucleótidos más cercanos al sitio de inicio de la transcripción (posiciones -10 a +5) (19). Por lo tanto, los nucleótidos involucrados en el reconocimiento especie-específico del promotor deben de encontrarse en esta región. Este reconocimiento no puede depender de las bases +1 a +3, las cuales se encuentran muy conservadas en mamífero (Figura 3B). Para identificar las bases con mayor relevancia en el mecanismo de reconocimiento, se hizo una mutagénesis exhaustiva del promotor humano, donde cada una de las bases en la región -10 a -1 fueron sustituidas por las otras tres bases. Por medio de ensayos de transcripción *in vitro* se analizó cómo estas mutaciones afectan los niveles de transcripción (Figura 5A).

La mutación de las posiciones -4, -3 y -1 del promotor ocasionaron el efecto más dramático en la eficiencia de la transcripción. Estas 3 posiciones son muy variables entre los promotores de mamífero, lo que sugiere que podrían tener más importancia en el reconocimiento especie-específico del promotor. Una fase esencial del inicio de la transcripción es

la desnaturalización del DNA alrededor del sitio de inicio. Durante este proceso, algunos nucleótidos dentro del promotor se encuentran desapareados, disponibles para interactuar y ser reconocidos por la mtRNAP o TFB2M. La estructura del IC muestra que en las posiciones que forman esta “burbuja”, la RNAP interactúa con la cadena templado, mientras que TFB2M interactúa con la cadena complementaria, o no-templado (19). De acuerdo con la mutagénesis extensiva del promotor (Figura 5A), las posiciones más importantes para el reconocimiento son las bases -4, -3 y -1. Estas tres posiciones podrían ser reconocidas en la cadena templado, en la cadena no-templado, o en ambas.

El enfoque que se utilizó para saber en qué cadena es reconocido cada posición, consistió en mutar nucleótidos del promotor humano solamente en una de las cadenas, ya sea en la templado o no-templado. Estos promotores, conteniendo una base desapareada en cada posición, se utilizaron para ensayos de transcripción *in vitro* para observar si se afectaban los niveles de transcripción. Así se descubrió que las posiciones importantes para el reconocimiento son las bases -1 y -4 en la cadena no-templado y las bases -3 y -4 de la cadena templado. Utilizando el sistema heterólogo

se confirmó que TFB2M reconoce específicamente las bases -1 y -4 de la cadena no-templado; mientras que la RNAP reconoce las bases -3 y -4 de la cadena templado (Figura 5B). Para demostrar la importancia de las posiciones -1, -3 y -4, dichas bases se sustituyeron en el promotor humano con las bases equivalentes de porcino. Estas tres mutaciones fueron

suficientes para que la maquinaria transcripcional porcina reconociera al promotor mitocondrial de humano (Figura 5C). Estos resultados demuestran que el mecanismo de reconocimiento (Figura 5B) se ha mantenido por al menos 80 millones de años, cuando vivió el último ancestro común entre *Sus scrofa* y *Homo sapiens*.

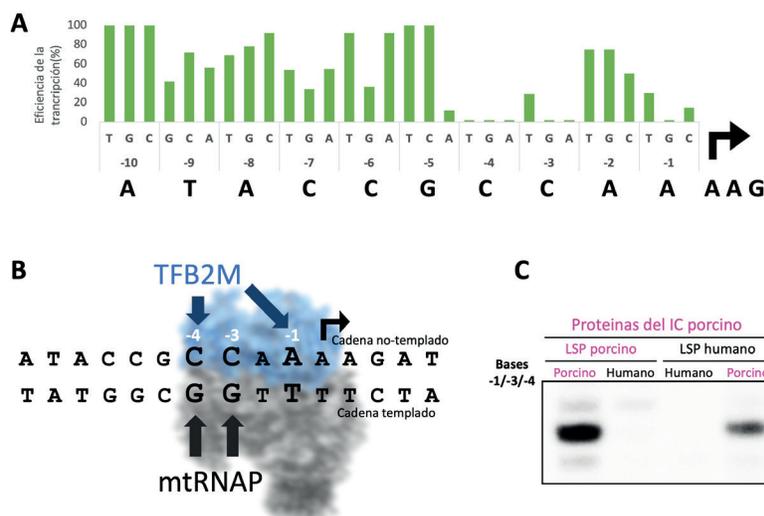


Figura 5. Las posiciones -1, -3 y -4 son las más importantes para el reconocimiento especie-específico. A. Las posiciones -10 a -1 del LSP humano se sustituyeron por las otras tres bases y se cuantificó su impacto en la transcripción *in vitro*. B. Modelo de reconocimiento del promotor. C. Ensayo de transcripción *in vitro* utilizando proteínas porcinas, y LSP humano o porcino con sustituciones en las posiciones -1, -3 y -4.

Coevolución de aminoácidos en la RNAP y los nucleótidos del promotor

La estructura cristalográfica del IC (19) muestra que dos elementos estructurales de la RNAP se encuentran cerca de las bases -3 y -4 del promotor mitocondrial: la hélice G y el asa de especificidad (llamada así por su homología con el elemento del mismo nombre en la RNAP del fago T7) (20). La estructura primaria de estos dos elementos se encuentra muy conservada en los mamíferos, pero los residuos 502 y 503 de la hélice G y 1101, 1102 y 1103 del asa de especificidad son muy variables (numeración de la mtRNAP humana) (17). Asimismo, estos aminoácidos se encuentran en posición de contactar las bases -3 y -4 del promotor. Si estos residuos participan en el reconocimiento de dichas bases, la sustitución de éstos por los aminoácidos equivalentes en porcino podría cambiar la afinidad de la RNAP, reconociendo las bases porcinas.

Una mutante de la RNAP humana que sustituye estos 5 residuos por sus contrapartes en porcino, pierde la afinidad por el promotor humano, pero es capaz de reconocer a una variante del promotor con la posición -3 sustituida por la base porcina (-3T, Figura 6A), indicando que estos residuos

determinan la especificidad por esta posición. No obstante, esta mutante no reconoce un promotor humano con la posición -4 sustituida por la base porcina a menos de que esta base se encuentre desapareada (17), lo cual sugiere que la interacción de TFB2M con la base -4 en la cadena complementaria es necesaria para el reconocimiento.

Una evidencia de que el mecanismo de reconocimiento observado en humano y cerdo es similar en otros mamíferos se observa en el orden Chiroptera. En el LSP de los murciélagos existen 3 variantes para la posición -3 de LSP: A, T o C. La variación de los aminoácidos en la hélice G y asa de especificidad correlaciona perfectamente con la variación del nucleótido que reconocen (Figura 6B), mostrando claramente el proceso de coadaptación entre la RNAP y el promotor mitocondrial.

Utilizando las secuencias de los promotores mitocondriales identificados, y correlacionándolos con los residuos de la RNAP involucrados en el reconocimiento, se puede hacer una aproximación del código de reconocimiento de la mtRNAP hacia su promotor (Figura 6C). Es importante resaltar que la aportación de los aminoácidos de TFB2M que reconocen las bases -1 y -4 en la cadena no-templado no se han tomado en cuenta porque no han sido identificados. Existen dos razones

para esto: primeramente, la base -1, que es reconocida por TFB2M, no pudo resolverse en la estructura del IC. La segunda razón es que el promotor utilizado para obtener esta estructura tiene mutaciones en la cadena no-templado (19). Esto se hizo para producir artificialmente la “burbuja” cerca del sitio de inicio, lo cual facilita la obtención de la estructura cristalográfica. Por lo tanto, las bases -1 y -4 en el promotor utilizado en la estructura reportada no son reconocidas por TFB2M, lo que imposibilita la identificación de interacciones

específicas entre dicho factor y el promotor. Actualmente nos encontramos trabajando en la obtención de la estructura del IC mitocondrial humano en presencia de una cadena no-templado con secuencia nativa. Muy probablemente, el código de reconocimiento podrá enriquecerse una vez que se identifiquen los aminoácidos de TFB2M que participan en el reconocimiento y podría ser útil para identificar promotores mitocondriales en especies que no cuenten con datos experimentales.

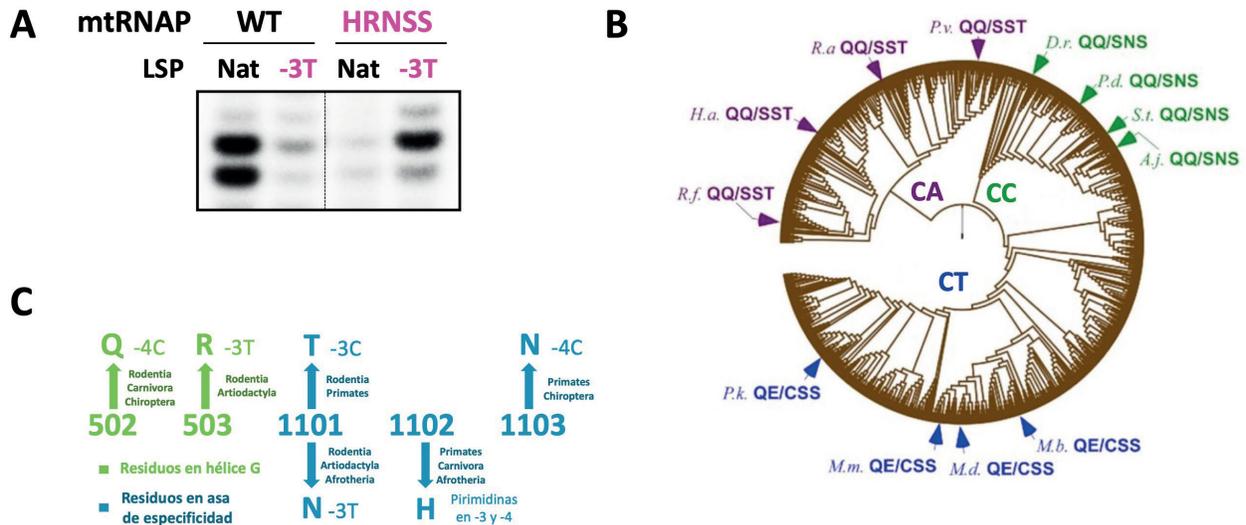


Figura 6. Aminoácidos de la mtRNAP que reconocen al promotor. A. Ensayo de transcripción *in vitro* utilizando la mtRNAP silvestre (WT) o la que sustituye 5 aminoácidos por los equivalentes porcinos (denominada HRNSS por las sustituciones de los residuos R502, E503, T1101, H1102 y N1103 de la mtRNAP humana). Se utilizó LSP nativo o con una sustitución en la posición -3 por la base porcina (-3T). B. Árbol filogenético del orden Chiroptera indicando los aminoácidos presentes en la hélice G y en el asa de especificidad de la mtRNAP en distintas especies. Se indica qué nucleótidos se reconocen en las posiciones -3 y -4 de LSP de dichas especies. Tomado de (17). C. Aminoácidos encontrados en las posiciones de la mtRNAP indicadas (numeración de la mtRNAP humana) y las bases que reconocen en el promotor. Únicamente se incluyeron las correlaciones encontradas en 2 o más órdenes, los cuales se indican.

Línea evolutiva del promotor mitocondrial

Analizando las secuencias de los promotores mitocondriales se hicieron las siguientes observaciones relevantes para analizar su evolución:

- Los promotores mitocondriales en las aves son una secuencia palindrómica repetida de ATs con dos sitios de inicio por cada promotor separados por dos nucleótidos (Figura 7A) (17, 21).
- Los promotores del género *Laevis* (Figura 7B) (22) y de todo el género Carnívora (Figura 3C, D) también es palindrómico con dos nucleótidos de separación: AT. A diferencia de las aves, ambos órdenes tienen un solo sitio de inicio para cada promotor.
- El superorden Afrotheria, el orden Perissodactyla y el orden Chiroptera también tienen promotores palindrómicos, pero con mayor separación entre promotores (18-21 nucleótidos) (17).
- La posición -5 de todos los promotores de mamífero es

una pirimidina, excepto en homínidos (humano, gorila, chimpanzé, orangután, gibón) que es guanina (Figura 2B, Figura 7).

- La posición -1 siempre es una timina, excepto en roedores, lagomorfos y primates, donde puede ser cualquier base (Figura 7).

Tomando en cuenta estas observaciones, proponemos que el promotor mitocondrial del último ancestro común de los mamíferos (hace 180 millones de años) era una secuencia palindrómica con un sitio de inicio para cada promotor. La posición -1 y -5 eran pirimidinas, probablemente timinas. Esta estructura se mantuvo al menos hasta la bifurcación de la clada de Laurasitheria (que incluye Eulipotyphla, Carnívora, Perissodactyla, Artiodactyla y Chiroptera) y la clada Euarchontoglires (que incluye Primates, Lagomorfos y Roedores). Las proteínas del IC sufrieron un cambio estructural en la clada de los Euarchontoglires, que toleró una purina en la posición -1. En esta clada también aparecieron promotores no palindrómicos. En la rama de los

homínidos, otro cambio estructural permitió la presencia de una purina en la posición -5. En la clada de Pegasoferae, se mantuvieron promotores palindrómicos, exceptuando la

rama de Artiodactyla (rumiantes, ballenas, suinos) en las que se incrementó el espacio entre promotores al igual que en Euarchontoglires.

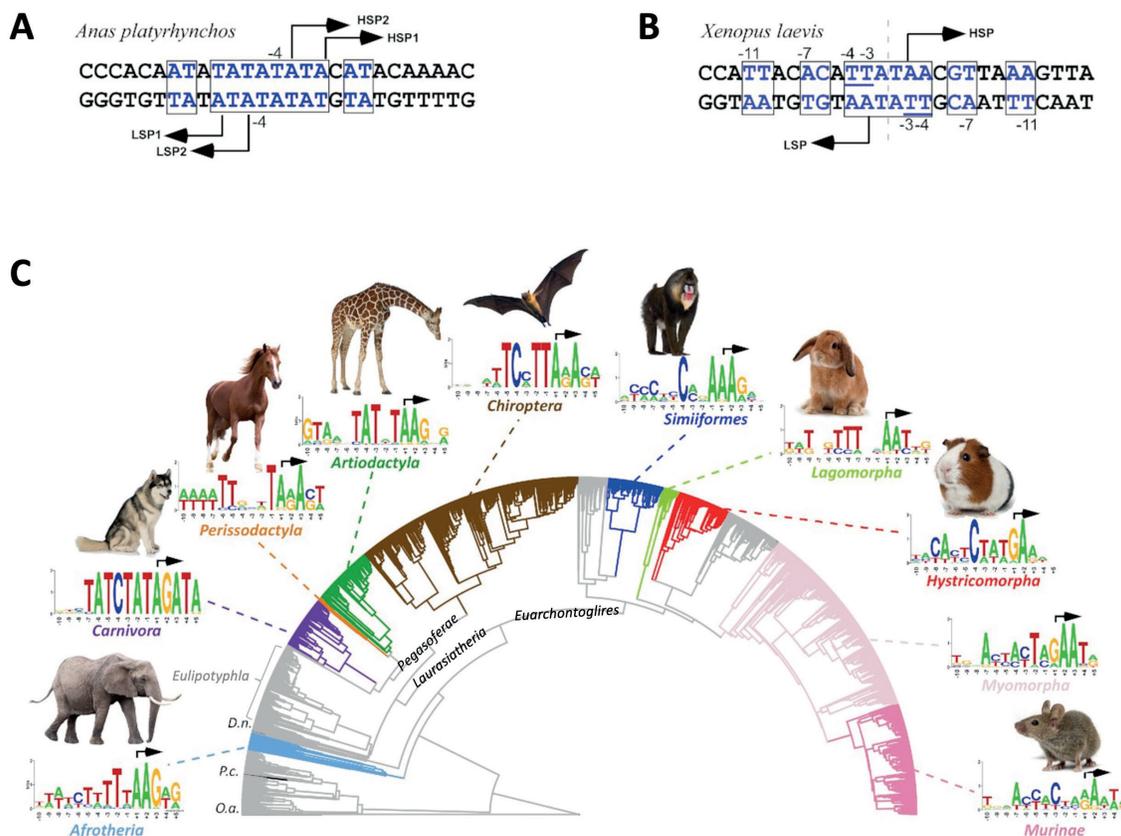


Figura 7. Evolución de los promotores mitocondriales. A. Estructura del promotor mitocondrial del Pato Real (*Anas Platyrhynchos*). B. Estructura del promotor mitocondrial de Rana de Uñas Africana (*Xenopus laevis*). C. Árbol filogenético de todos los mamíferos. En color se muestran las especies cuyo promotor fue encontrado en (17). La conservación de la región cercana al sitio de inicio de cada grupo se ilustra con logos (weblogo.berkeley.edu). Modificado de (17).

Las proteínas del IC y su papel en el proceso de especiación

Como ya se mencionó, las proteínas que participan en interacciones mitonucleares tienen mayor probabilidad de participar en la especiación. El proceso de especiación se resume en los siguientes tres pasos (23):

1. Una población se aísla de otros individuos de su misma especie, generalmente por barreras geográficas, aunque pueden existir otras causas.
2. La población aislada desarrolla características que difieren de la población original y que pueden dificultar la reproducción entre ambas poblaciones. En esta fase no existe un proceso de especiación completo, pero si suceden cruces entre dos individuos de las distintas poblaciones, podría producirse una reducción de la adecuación (*fitness*) en la progenie. Esto se conoce como incompatibilidad de híbridos (24).
3. La incompatibilidad genética entre las dos poblaciones es

tan grande que la reproducción entre ellas es inviable. El proceso de especiación se ha completado.

Hipóticamente, cualquier gen cuya función dependa de su interacción con otro puede participar en el proceso de especiación. Sin embargo, las interacciones entre el genoma mitocondrial y nuclear son un caso especial, debido a las altas tasas de mutación en el genoma mitocondrial, a las cuales el genoma nuclear debe adaptarse rápidamente (2).

Estudios sobre interacciones mito-nucleares y su papel en la especiación han señalado a la mtRNAP mitocondrial como clave en este proceso. Uno de ellos ha sido una investigación en *Tigriopus californicus*, un crustáceo que muestra una gran divergencia entre poblaciones y que se utiliza como modelo de las etapas tempranas de especiación. *T. californicus* muestra incompatibilidad de híbridos debida a la disrupción de interacciones mito-nucleares (25). En este organismo, la mtRNAP muestra altas tasas de evolución y selección positiva

(26), sugiriendo que la enzima se adapta continuamente a los cambios en el DNA mitocondrial. De acuerdo con esto, se ha demostrado que la interacción entre la mtRNAP y el genoma mitocondrial se encuentra afectada en los híbridos incompatibles: cuando la RNAP heredada en el híbrido no coincide con el DNA mitocondrial de su población de origen, éste tiene una menor probabilidad de sobrevivir (27). Esto indica que existen polimorfismos en el DNA mitocondrial a las que la RNAP se ha adaptado, probablemente en el promotor. Otra investigación que respalda el papel de la mtRNAP en especiación se realizó en reptiles: como resultado de una antigua barrera geográfica que ya ha desaparecido, dos poblaciones distintas de camaleón mediterráneo (*Chamaeleo chamaeleon*) estuvieron segregadas por al menos 1 millón de años. Actualmente existe intercambio genético nuclear entre ellos, pero el genoma mitocondrial sigue siendo específico de cada población (28). Cuando se buscaron polimorfismos en el DNA nuclear que correlacionaran con el DNA mitocondrial de cada población, uno de ellos se mapeó al asa de especificidad de la mtRNAP. Interesantemente, mientras que las dos variantes se encontraban en las dos poblaciones, el polimorfismo raramente se identificó como homocigoto en combinación con el DNA mitocondrial de la población opuesta (29), indicando que, si se hereda la mtRNAP que no corresponde al DNA mitocondrial de su población, la sobrevivencia se reduce.

En cuanto a TFB2M, existe evidencia de que este gen también compensa continuamente los cambios en el genoma mitocondrial, ya que se ha encontrado que este gen está sujeto a selección positiva en humano (30), dragones de Komodo (31) y la rata topo desnuda (32).

Hasta la fecha no se ha encontrado evidencia de que TFAM participe en procesos de especiación, lo cual concuerda con nuestras observaciones de que TFAM no participa en el reconocimiento especie-específico del promotor (Figura 4B).

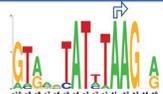
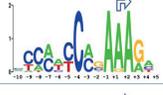
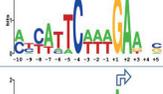
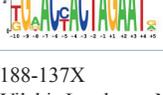
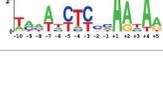
HSP podría acelerar la evolución de los promotores

Además de su papel en la transcripción, la mtRNAP sintetiza los cebadores o “primers” necesarios para que la DNA Polimerasa mitocondrial replique el genoma (Figura 2A). El cebador de la cadena pesada se sintetiza a partir de LSP, mientras que el cebador de la cadena ligera se sintetiza a partir de una estructura de tallo-bucle de DNA llamada *OriL* muy conservada en todas las especies animales (33). Esta estructura se forma cuando el replisoma mitocondrial utiliza al DNA complementario a *OriL* como templado. La síntesis del cebador de la cadena ligera por parte de la RNAP no requiere de TFAM o TFB2M.

Debido a la existencia de *OriL*, únicamente LSP es necesario para la replicación, aunque ambos promotores son necesarios para la transcripción. Como consecuencia, una mutación en LSP que reduzca su reconocimiento por parte del IC no solamente causaría una reducción en la transcripción, sino que disminuiría su propia replicación, y el genoma mutado

tendería a desaparecer. Por el contrario, una mutación en HSP que afecte su reconocimiento únicamente reducirá la transcripción, pero no afectará su propia replicación. A un genoma que es capaz de replicarse, pero no de producir transcritos se le denomina “DNA mitocondrial egoísta”. Debido a que cada célula puede tener entre 1000 y 10,000 copias de DNA mitocondrial (34, 35), el individuo no se vería seriamente afectado por unas cuantas copias que no produzcan transcritos, y el genoma con HSP mutado, o DNA mitocondrial egoísta, podría estar presente por varias generaciones. Con el tiempo, mutaciones nucleares adaptativas podrían compensar la mutación en HSP sin dejar de reconocer los promotores silvestres. Estas mutaciones nucleares podrían dar ventaja al individuo, que ahora puede producir transcritos de ambas variantes de HSP, y comenzar a acumularse en la población. En estas condiciones, LSP podría tener ahora la misma sustitución que HSP, ya que la maquinaria de IC sería capaz de reconocerla. Sin tanta presión selectiva hacia el reconocimiento de los promotores originales, las proteínas del IC podrían sufrir una nueva mutación que únicamente reconozca los nuevos promotores. En este punto, la cruce con individuos de otra población que sea portadora de los promotores originales podría dar lugar a híbridos incompatibles, contribuyendo al proceso de especiación. Según este modelo, la alta diversidad que existe en los promotores mitocondriales podría deberse, al menos en parte, a mutaciones que originalmente ocurrieron en HSP y que luego se extendieron a LSP. Efectivamente, al comparar los dos promotores en diferentes especies de mamíferos, puede observarse menor conservación de HSP que de LSP, sobre todo en los promotores no palindrómicos, en los cuales un promotor puede mutar sin afectar al otro (Tabla I). Adicionalmente, se ha reportado que en algunas cruces de híbridos incompatibles del crustáceo *T. californicus*, el DNA mitocondrial produce menos transcritos y se replica en exceso (27), sugiriendo que existen adaptaciones del DNA nuclear que contrarrestan al DNA egoísta, que son interrumpidos en el híbrido. Éstas podrían ser las adaptaciones de la maquinaria transcripcional que reconocen a HSP mutado.

Tabla I. Comparación de la conservación de LSP y HSP en algunos órdenes y familias

Orden o Familia	LSP	HSP
Artiodactyla		
Simiiformes		
Hystricomorpha		
Murinae		

¿Qué mutaciones en el promotor podrían afectar su reconocimiento? La mutación exhaustiva de LSP humano demostró que son tres las posiciones cuya mutación puede abatir la transcripción casi por completo (Figura 5A). Esto contrasta con el mecanismo de reconocimiento en núcleo (36) o bacteria (37), en los que el reconocimiento está repartido entre más posiciones. De acuerdo con nuestros datos, no son muchos los aminoácidos en la mtRNAP que deben cambiar para reconocer mutaciones en las posiciones -3 y -4. Lo anterior sugiere que la alta tasa de mutación en mitocondria forzó al

núcleo a dar mayor flexibilidad a las secuencias del promotor mitocondrial, reduciendo la interfase de reconocimiento para lograr adaptarse a los cambios rápidamente.

El DNA mitocondrial es un genoma altamente variable, y la diversidad de los promotores mitocondriales es un ejemplo de ello. Los mecanismos por los que la maquinaria transcripcional se adapta a esta variabilidad posicionan a la transcripción mitocondrial como un importante modelo de estudio de coevolución mito-nuclear.

Referencias

- Lynch, M., Koskella, B., and Schaack, S. (2006) Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science* **311**, 1727-1730 10.1126/science.1118884
- Tobler, M., Barts, N., and Greenway, R. (2019) Mitochondria and the Origin of Species: Bridging Genetic and Ecological Perspectives on Speciation Processes. *Integr Comp Biol* **59**, 900-911 10.1093/icb/icz025
- Burton, R. S., and Barreto, F. S. (2012) A disproportionate role for mtDNA in Dobzhansky-Muller incompatibilities? *Mol Ecol* **21**, 4942-4957 10.1111/mec.12006
- Healy, T. M., and Burton, R. S. (2020) Strong selective effects of mitochondrial DNA on the nuclear genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 6616-6621 10.1073/pnas.1910141117
- Weaver, R. J., Rabinowitz, S., Thueson, K., and Havird, J. C. (2022) Genomic Signatures of Mitonuclear Coevolution in Mammals. *Mol Biol Evol* **39**, 10.1093/molbev/msac233
- Rawson, P. D., and Burton, R. S. (2002) Functional coadaptation between cytochrome c and cytochrome c oxidase within allopatric populations of a marine copepod. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12955-12958 10.1073/pnas.202335899
- Garvin, M. R., Bielawski, J. P., and Gharrett, A. J. (2011) Positive Darwinian selection in the piston that powers proton pumps in complex I of the mitochondria of Pacific salmon. *PLoS One* **6**, e24127 10.1371/journal.pone.0024127
- Scott, G. R., Schulte, P. M., Egginton, S., Scott, A. L., Richards, J. G., and Milsom, W. K. (2011) Molecular evolution of cytochrome C oxidase underlies high-altitude adaptation in the bar-headed goose. *Mol Biol Evol* **28**, 351-363 10.1093/molbev/msq205
- Karakaidos, P., and Rampias, T. (2020) Mitonuclear Interactions in the Maintenance of Mitochondrial Integrity. *Life (Basel)* **10**, 10.3390/life10090173
- Barreto, F. S., and Burton, R. S. (2013) Evidence for compensatory evolution of ribosomal proteins in response to rapid divergence of mitochondrial rRNA. *Mol Biol Evol* **30**, 310-314 10.1093/molbev/mss228
- Ellison, C. K., and Burton, R. S. (2008) Genotype-dependent variation of mitochondrial transcriptional profiles in interpopulation hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15831-15836 10.1073/pnas.0804253105
- Morozov, Y. I., Agaronyan, K., Cheung, A. C., Anikin, M., Cramer, P., and Temiakov, D. (2014) A novel intermediate in transcription initiation by human mitochondrial RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **42**, 3884-3893 10.1093/nar/gkt1356
- Morozov, Y. I., Parshin, A. V., Agaronyan, K., Cheung, A. C., Anikin, M., Cramer, P. et al. (2015) A model for transcription initiation in human mitochondria. *Nucleic Acids Res* **43**, 3726-3735 10.1093/nar/gkv235
- Chang, D. D., and Clayton, D. A. (1986) Precise assignment of the light-strand promoter of mouse mitochondrial DNA: a functional promoter consists of multiple upstream domains. *Mol Cell Biol* **6**, 3253-3261 10.1128/mcb.6.9.3253-3261.1986
- Chang, D. D., and Clayton, D. A. (1986) Precise assignment of the heavy-strand promoter of mouse mitochondrial DNA: cognate start sites are not required for transcriptional initiation. *Mol Cell Biol* **6**, 3262-3267 10.1128/mcb.6.9.3262-3267.1986
- Chang, D. D., and Clayton, D. A. (1984) Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell* **36**, 635-643 10.1016/0092-8674(84)90343-x
- Zamudio-Ochoa, A., Morozov, Y. I., Sarfallah, A., Anikin, M., and Temiakov, D. (2022) Mechanisms of mitochondrial promoter recognition in humans and other mammalian species. *Nucleic Acids Res* **50**, 2765-2781 10.1093/nar/gkac103
- Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N. G., and Gustafsson, C. M. (2004) The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *EMBO J* **23**, 4606-4614 10.1038/sj.emboj.7600465
- Hillen, H. S., Morozov, Y. I., Sarfallah, A., Temiakov, D., and Cramer, P. (2017) Structural Basis of Mitochondrial Transcription Initiation. *Cell* **171**, 1072-1081 e1010 10.1016/j.cell.2017.10.036
- Cheetham, G. M., Jeruzalmi, D., and Steitz, T. A. (1999) Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex. *Nature* **399**, 80-83 10.1038/19999
- L'Abbe, D., Duhaime, J. F., Lang, B. F., and Morais, R. (1991) The transcription of DNA in chicken mitochondria initiates from one major bidirectional promoter. *J Biol Chem* **266**, 10844-10850, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710214>
- Antoshechkin, I., and Bogenhagen, D. F. (1995) Distinct roles for two purified factors in transcription of *Xenopus* mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* **15**, 7032-7042 10.1128/MCB.15.12.7032
- Nosil, P., Harmon, L. J., and Seehausen, O. (2009) Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends Ecol Evol* **24**, 145-156 10.1016/j.tree.2008.10.011
- Johnson, N. (2008) Hybrid incompatibility and speciation. *Nature Education* **1**,
- Ellison, C. K., and Burton, R. S. (2008) Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution* **62**, 631-638 10.1111/j.1558-5646.2007.00305.x
- Barreto, F. S., Watson, E. T., Lima, T. G., Willett, C. S., Edmands, S., Li, W. et al. (2018) Genomic signatures of mitonuclear coevolution across populations of *Tigriopus californicus*. *Nat Ecol Evol* **2**, 1250-1257 10.1038/s41559-018-0588-1
- Ellison, C. K., and Burton, R. S. (2010) Cytonuclear conflict in interpopulation hybrids: the role of RNA polymerase in mtDNA transcription and replication. *J Evol Biol* **23**, 528-538 10.1111/j.1420-9101.2009.01917.x
- Bar-Yaacov, D., Arbel-Thau, K., Zilka, Y., Ovadia, O., Bouskila, A., and Mishmar, D. (2012) Mitochondrial DNA variation, but not nuclear DNA, sharply divides morphologically identical chameleons along an ancient geographic barrier. *PLoS One* **7**, e31372 10.1371/journal.pone.0031372
- Bar-Yaacov, D., Hadjivasiliou, Z., Levin, L., Barshad, G., Zarivach, R., Bouskila, A. et al. (2015) Mitochondrial Involvement in Vertebrate Speciation? The Case of Mito-nuclear Genetic Divergence in Chameleons. *Genome Biol Evol* **7**, 3322-3336 10.1093/gbe/evv226
- van der Lee, R., Wiel, L., van Dam, T. J. P., and Huynen, M. A. (2017)

- Genome-scale detection of positive selection in nine primates predicts human-virus evolutionary conflicts. *Nucleic Acids Res* **45**, 10634-10648 10.1093/nar/gkx704
31. Lind, A. L., Lai, Y. Y. Y., Mostovoy, Y., Holloway, A. K., Iannucci, A., Mak, A. C. Y. *et al.* (2019) Genome of the Komodo dragon reveals adaptations in the cardiovascular and chemosensory systems of monitor lizards. *Nat Ecol Evol* **3**, 1241-1252 10.1038/s41559-019-0945-8
 32. Sahm, A., Almada-Pagan, P., Bens, M., Mutalipassi, M., Lucas-Sanchez, A., de Costa Ruiz, J. *et al.* (2019) Analysis of the coding sequences of clownfish reveals molecular convergence in the evolution of lifespan. *BMC Evol Biol* **19**, 89 10.1186/s12862-019-1409-0
 33. Sarfallah, A., Zamudio-Ochoa, A., Anikin, M., and Temiakov, D. (2021) Mechanism of transcription initiation and primer generation at the mitochondrial replication origin OriL. *EMBO J* **40**, e107988 10.15252/embj.2021107988
 34. D'Erchia, A. M., Atlante, A., Gadaleta, G., Pavesi, G., Chiara, M., De Virgilio, C. *et al.* (2015) Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity. *Mitochondrion* **20**, 13-21 10.1016/j.mito.2014.10.005
 35. Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S., Sadlock, J., Jagiello, G., and Schon, E. A. (1995) Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet* **57**, 239-247, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7668249>
 36. Lenhard, B., Sandelin, A., and Carninci, P. (2012) Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat Rev Genet* **13**, 233-245 10.1038/nrg3163
 37. Haugen, S. P., Ross, W., and Gourse, R. L. (2008) Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat Rev Microbiol* **6**, 507-519 10.1038/nrmicro1912



DRA. ANGELICA ZAMUDIO OCHOA
ORCID: 0000-0002-6347-5789.

Egresada de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Durante su doctorado en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM estudió la traducción mitocondrial en levadura. Su investigación fue condecorada con el "Premio Socios Fundadores 2012" de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.

Realizó un postdoctorado nacional en el Instituto Nacional de Cancerología y otro en el extranjero, en la Universidad de Jefferson, Philadelphia, PA, USA.

Es miembro de la Sociedad Mexicana de Bioquímica y de la American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Ha sido invitada a impartir conferencias en Universidades Nacionales y Extranjeras, y su trabajo se ha presentado en 14 congresos nacionales e internacionales.

Cuenta con 8 artículos en revistas de arbitraje e indizadas y un artículo de libro.

Actualmente es Investigadora Asociada en la Universidad de Jefferson, donde estudia los procesos de transcripción y replicación mitocondrial, así como el mecanismo de herencia monoparental del genoma mitocondrial en mamífero.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquím. 47 (2023) 175-182

Memoria del 50º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Problemática del tráfico ilícito de patrimonio cultural.

Problematic with the illicit traffic of cultural heritage.

Martha Isabel Tapia González^{1*}

¹ Escuela Nacional de Conservación, Restauración y Museografía del Instituto Nacional de Antropología e Historia

*Correspondencia. Escuela Nacional de Conservación, Restauración y Museografía del Instituto Nacional de Antropología e Historia
General Anaya #187, San Diego Churubusco, Coyoacán, CDMX (México), C.P. 04200, +52 5550223440 ext. 412127
martha_tapia_g@encrym.edu.mx,

Resumen

En este artículo se aborda el tipo de patrimonio cultural que hay en el país destacando, los bienes muebles y los bienes adosados a la arquitectura, que deben ser protegidos por el Estado mexicano. Se define qué es el saqueo, robo y tráfico ilícito del patrimonio cultural y el papel que juega México en la cadena delictiva. Se plantean como ejemplo algunos datos que las instituciones han reportado en esta materia y la disparidad entre ellas.

Se plantea el marco legal para la protección y recuperación de ellos, y las instituciones participantes en la investigación y recuperación a nivel nacional e internacional.

Se describe la problemática del robo y tráfico ilícito del patrimonio y la participación del restaurador como perito para la identificación y recuperación de los bienes muebles. Describiendo la metodología realizada y los análisis que se llevan a cabo para identificar los monumentos. Se describen algunas de las medidas que deben de tomarse a nivel nacional para incidir en la protección, recuperación y valoración del patrimonio mexicano.

Palabras clave: patrimonio cultural, saqueo, robo, tráfico ilícito y recuperación.

Abstract

This article addresses the type of cultural heritage that exists in the country, highlighting movable property and property attached to architecture that must be protected by the Mexican State. It is defined as the looting, theft and illicit trafficking of cultural heritage and the role that Mexico plays in the criminal chain. Some data that the institutions have reported in this matter and the disparity between them are presented as an example.

The legal framework for the protection and recovery of them, and the institutions participating in the investigation and recovery at national and international level are proposed.

The problem of theft and illicit traffic of patrimony and the participation of the restorer as an expert for the identification and recovery of movable property are described. Describing the methodology carried out and the analyzes carried out to identify the monuments. Some of the measures that must be taken at the national level to influence the protection, recovery and valuation of Mexican heritage are described.

Keywords: cultural heritage, looting, theft, illicit trafficking and recovery.

Problemática del tráfico ilícito de patrimonio cultural

Por definición, los bienes culturales son los muebles o muebles adosados a la arquitectura y los inmuebles que tengan importancia para el patrimonio cultural de México, tales como los monumentos arquitectónicos, de arte o de historia, religiosos o seculares, los bienes arqueológicos, los conjuntos de construcciones que ofrezcan un interés histórico o artístico, las obras de arte, manuscritos, libros y otros objetos de interés histórico, artístico, arqueológico o paleontológico, así como las colecciones científicas y las colecciones importantes de documentos, libros o de archivos. Se incluyen los bienes muebles como instrumentos musicales, pintura de caballete, estatuas, vestimenta e indumentaria, mobiliario, objetos litúrgicos, documentos, etc., así como los bienes muebles adosados a la arquitectura que son todos aquellos bienes que por haber sido diseñados proyectados y elaborados para un espacio arquitectónico específico forman una unidad indivisible con él, sin importar sus características materiales, técnicas y formales. Desde este punto de vista, podemos incluir en este grupo a todas aquellas manifestaciones plásticas adosadas como pintura mural; obra escultórica de bulto entre las que encontramos cruces atriales, relieves en cal, yeso o piedra, mosaicos, y otros objetos de muy diversa naturaleza como retablos, mobiliario adosado como sillerías, púlpitos, rejas, balaustradas, celosías, lambrines, pilas de agua bendita y bautismales entre otros. También pertenecen a este grupo objetos tales como fuentes, artesonados, entre otros. Todos estos bienes son monumentos que quedan protegidos bajo la *Ley Federal sobre Monumentos y Zonas Arqueológicas, Artísticas e Históricas, en función de su temporalidad*.

Cuando se habla de robo y tráfico ilícito de patrimonio cultural debe entenderse por robo a la sustracción del patrimonio sin la autorización de quien lo tiene en resguardo [1], mientras que, el tráfico ilícito es cualquier movimiento o transacción ilegal de bienes culturales tanto dentro del país como en el extranjero. Sin embargo, es difícil saber la magnitud del ilícito. Algunos autores como Morales dicen que “Se desconocen cifras aproximadas de bienes culturales robados o comerciados ilegalmente debido a la falta de denuncias o reportes e investigación en este tema” [2]. El comercio ilícito de bienes culturales está generalmente considerado como una de las formas más frecuentes del crimen internacional.

El comercio de patrimonio robado o hurtado es uno de los delitos que tienen grandes ganancias económicas en el mercado negro de arte.

En los últimos tiempos y como fenómeno mundial, los bienes culturales han sufrido un fuerte aumento en cuanto a robos en el país y exportación ilícita en busca de mercados adecuados y lucrativos.

Los organismos especializados creen que el aumento no ha sido sólo cuantitativo, sino que hay mayor y frecuente denuncia de estos ilícitos, además de que se comunica el hecho en medios de comunicación tanto nacionales como

internacionales.

Esta es una de las razones por las que el tema del robo y el tráfico ilícito de bienes culturales preocupa a las autoridades. En México el saqueo de los sitios arqueológicos es una práctica común, se debe a distintos factores dentro de los que se encuentran:

- Descubrimientos fortuitos realizados por los habitantes de los poblados, descuido y urbanismo.
- Saqueo organizado, financiado por redes criminales organizadas que pagan a los pobladores por buscar objetos.
- Extrema pobreza.

El saqueo destruye o daña el lugar en el que se encuentran los objetos, impidiendo así la reconstitución del contexto de descubrimiento, que es esencial para entender la historia de los sitios arqueológicos. A menudo, estos lugares son la única fuente de información existente sobre periodos históricos específicos. Se estima que un 80% de todos los sitios arqueológicos conocidos en la península de Yucatán han sido saqueados. Es importante entender que el universo de atención que tenemos en el país es muy grande, existen aproximadamente 200,000 sitios arqueológicos, de los cuales se encuentran registrados poco más de 43,330; se cuenta con alrededor de 101,780 inmuebles considerados monumentos históricos, de los cuales 17,000 son de carácter religioso. Tan sólo bajo la custodia y responsabilidad del INAH se cuentan alrededor de 1 millón de bienes muebles y muebles asociados a los inmuebles de naturaleza arqueológica e histórica. Hay al menos 114 museos, varios depósitos de bienes culturales y 193 zonas arqueológicas y paleontológicas abiertas al público bajo la responsabilidad del Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH). Se estima que el Instituto Nacional de Antropología e Historia es responsable también de alrededor de 1,797,094 de piezas arqueológicas, 4,000,000 documentos catalogados en la Biblioteca Nacional de Antropología, 190,694 monumentos históricos muebles, restos humanos de 24,600 individuos, y 960 equipos de transporte; por mencionar algunos objetos que forman parte de nuestro patrimonio cultural. Como se puede ver el país cuenta con un vasto patrimonio en su territorio. La revista *Arqueología Mexicana* -editada por el INAH-, a su vez, publicaría que, en el transcurso del tiempo, 10 mil 485 sitios prehispánicos, de los 35 mil que hay en México habían sido objeto de saqueos de diverso tipo. (*Arqueología Mexicana* 1996) [3]. El Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH) dió a conocer que de 1997 a 2010 se robaron más de dos mil 655 objetos. Las piezas arqueológicas fueron mil 420 piezas, mientras que, las piezas catalogadas como históricas sumaron un total de mil 235 [4]. Entre 2010 y 2015 el propio INAH presentó 36 denuncias ante la Procuraduría General de la República (PGR): una decena en 2010; ocho en 2011; seis en 2012 y 2013 y tres en 2014 y 2015, respectivamente. A esas denuncias se agregan las correspondientes al saqueo en 2014: las seis acusaciones ante la FGR por robo de monumentos arqueológicos muebles, una en Chiapas, dos en el Estado de

México, una en Puebla, una en Michoacán y la última en la Ciudad de México. De 1991 al 2012 la FGR reporta que cuenta con 320 denuncias en estados como Puebla, Tlaxcala, Jalisco, Hidalgo, Estado de México y Oaxaca. Siendo el estado de Puebla, el que cuenta con mayor número de denuncias, con 720 objetos robados. En el 2012 un informe de la Auditoría de la federación hecha al INAH establece que, “Respecto del patrimonio histórico, se presentaron 193 denuncias por robo, de las cuales el 49.2% (95 denuncias) permanece abierto y el 50.8% (98 denuncias) se concluyó, recuperando 5 bienes muebles.” Del 2012 al 2016 reportan 5 denuncias. Lo sorprendente, es que no existen denuncias en el 2014 y 2016, lo cual nos podría hablar de la reducción del delito. Sin embargo, basta con entrar a Internet y revisar las notas periodísticas para ver que esto no es así. A nivel internacional existen algunas bases de datos que pueden darnos alguna idea de lo que implica este delito. La policía de Scotland Yard cuenta con una base de 57,500 objetos robados, mientras que la Organización Internacional de Policía Criminal (Interpol) cuenta en sus registros con alrededor de 40,000 piezas, siendo la base de la Agencia Federal de Investigación (FBI) la que tan sólo cuenta con 8,000. Como podemos ver las cifras son muy distintas, sin embargo, una institución privada como Art Loss Register (Registro de Obras de Arte Desaparecidas) tiene en sus registros 350,000 obras robadas o en paradero desconocido [5]. Gracias a su base de datos una empresa tiene más información sobre este espinoso asunto que los tres cuerpos policiales citados juntos. Todo esto nos habla de la gran disparidad de datos que hay a nivel internacional y nacional. El problema del mercado negro de bienes culturales es tan serio que se han tomado acciones en el ámbito internacional por instituciones como la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), la Organización Internacional de Policía Criminal (Interpol) o el Consejo Internacional de Museos. Buscando homogeneizar las denuncias de robo de arte en bases internacionales y herramientas para la identificación de bienes culturales de varios países en las listas rojas, que ayudan a los aduaneros a identificar el patrimonio cultural de los países en los puntos fronterizos [6] México cuenta actualmente con una base legal para la protección de su patrimonio cultural. En primer lugar, se encuentra la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, le siguen los convenios, acuerdos y tratados internacionales, las leyes, los decretos, los reglamentos y los códigos. Dentro de las leyes encontramos, la *Ley General de Bienes Nacionales*, la *Ley de las Asociaciones Religiosas y Culto Público*; la *Ley Federal Sobre Monumentos y Zonas Arqueológicas, Artísticas e Históricas*; y las leyes Orgánicas del Instituto Nacional de Antropología e Historia, del Poder Judicial de La Federación, y de la Procuraduría General de la República; la *Ley General de Archivos* y las leyes estatales. Dentro de los reglamentos de las leyes se tiene: el *Reglamento de las Asociaciones Religiosas*, el *Reglamento de la Ley Federal sobre*

Monumentos y el Reglamento del Decreto que prohíbe la exportación de documentos originales relacionados con la historia de México, y de los libros que por su rareza sean difícilmente sustituibles del 13 de julio de 1974, entre otras. La Carta Magna establece en el artículo 73 XXV que el Congreso tiene facultad para legislar sobre vestigios o restos fósiles y sobre monumentos arqueológicos, artísticos e históricos, cuya conservación sea de interés nacional...[7] Como se puede ver la Constitución resalta la preocupación del Estado mexicano en la protección de los monumentos de nuestro país, en donde la Secretaría de Cultura, a través del Instituto Nacional de Antropología e Historia, protege los bienes arqueológicos, históricos y paleontológicos, y el Instituto Nacional de Bellas Artes y Literatura protege los monumentos artísticos. Siendo los objetivos del INAH: la investigación científica sobre antropología e historia, relacionada principalmente con la población del país y con la conservación y restauración del patrimonio cultural arqueológico e histórico, así como el paleontológico; la protección, conservación, restauración y recuperación de ese patrimonio, y la promoción y difusión de las materias y actividades que son de su competencia. Es a través de sus Coordinaciones Nacionales que realiza sus labores de protección y recuperación del patrimonio cultural. En el país existen además otras instituciones que están avocadas a la protección de nuestro patrimonio como son el Archivo General de la Nación y la Fiscalía General de la República a través de la Unidad Especializada en Investigación de delitos contra el Ambiente y Previstos en Leyes Especiales (UEIDAPLE); mientras que para la prevención del tráfico ilícito y recuperación de piezas participan además la Secretaría de Relaciones Exteriores a través de sus embajadas y consultorías jurídicas; y la Dirección General de Aduanas. Del mismo modo, coadyuva la Secretaría de Gobernación con las Asociaciones Religiosas, la Guardia Nacional y el Instituto de Administración y Avalúos de Bienes Nacionales (INDABIN). Sin embargo, existen pocos instrumentos normativos que permiten conocer el trabajo interinstitucional que realizan y las acciones que llevan a cabo para reducir el ilícito. El patrimonio cultural sale del país por diversos medios como son el transporte terrestre, aéreo y marítimo, en no pocas ocasiones sale como si fuera menaje de casa o como material de construcción, en el caso de los bienes adosados a la arquitectura como los relieves o la pintura mural. Es así como muchas piezas son fracturadas antes de salir del país para volverlas a unir ya que salieron. Lamentablemente la FGR ha comprobado que dentro de esta red de tráfico ilícito hay involucradas personas que intervienen las piezas eliminando capas o agregando otros elementos para poder hacer que las piezas no sean identificadas como las robadas. Todos estos bienes son sacados del país y transportados a otros países en donde son vendidos a museos y galerías, casas subastadoras y colecciones privadas. El patrimonio mexicano va a mercados tan variados como a Estados Unidos, Europa y Asia. Uno de los principales problemas a lo que se

enfrenta el Estado despojado de sus bienes es que las casas subastadoras, galerías y coleccionistas no están obligados a revelar el nombre de quien les vendió el bien. La forma más novedosa de comercio ilícito de este tipo de patrimonio es el realizado a través de Internet, en donde muchas veces se venden en casas subastadoras o anónimamente. México es un país de origen, tránsito y destino de patrimonio cultural. El país como lugar de origen de bienes culturales que son transferidos, excavados ilícitamente, saqueados o robados del territorio nacional. Esto responde a que existen compradores para ellos y está determinado por la oferta y demanda en el mercado internacional. Como lugar de destino se importan al país bienes culturales de otros países con el propósito de que estos se vendan en el mercado nacional y permanezcan dentro del territorio nacional. Y como tránsito, los bienes culturales de otros Estados que llegan a nuestro territorio, para ser transportados o transferidos a otro país. En donde los bienes culturales pueden participar en alguna exposición para “legalizarse” o “legitimarse”. México funge como corredor entre la frontera con Estados Unidos, siendo el mercado más grande de arte en el mundo. Para entender un poco como ha funcionado el mercado tenemos un ejemplo de piezas que siempre han sido muy cotizadas en el mercado. Este es el caso de los llamados perritos de Colima que en los años 30 del siglo pasado costaba \$2 USD en México y aproximadamente \$25USD en Nueva York. Hacia 1948, la misma pieza podía costar entre \$250 y \$400 USD, mientras que en 1970 el precio alcanzaba el doble o el triple. En el 2010 a pesar de las fluctuaciones, una pieza de este tipo llegó a costar \$22,500 USD. El 90 % de los ejemplares conocidos provienen de excavaciones ilegales. Conforme a INTERPOL, posteriormente al robo, los objetos pueden ponerse en el mercado legal o en el mercado negro después de varios años, con la esperanza de que las autoridades se olviden de ellos. En otros casos un coleccionista adquiere una obra de arte inmediatamente después de su robo.

Han establecido que la modificación de obras de arte es un fenómeno en alza que puede ir de la simple copia de una obra de arte para conseguir altos precios de venta con una mínima inversión, hasta el “retoque” de una pieza para atribuirle falsamente a un artista reconocido [8]. Cuando se roban las obras en muchos casos se modifica sus características formales para poder entrar al mercado del arte. Es así como se pueden agregar elementos, modificar personajes e incluso eliminar algunos de ellos. Todo esto con la idea de dificultar su identificación. En otros casos, las modificaciones consisten en añadir o eliminar total o parcialmente firmas o inscripciones de la pintura de caballete. Se han presentado casos en que la obra es de un autor y se conserva la primera letra del apellido o nombre para modificarla y atribuirle a un autor más famoso. Todo ello con el fin de poder obtener un mayor precio en el mercado de arte. Por lo que contar con fotografías de detalles es fundamental para su recuperación. Un ejemplo de ello es la obra llamada “Adán y Eva expulsados del paraíso”, robada en el año 2000 en Hidalgo y repatriada a México [9]. Cuando

fue recuperada se le había repintado parte de la inscripción conservando tan sólo la fecha. Las pinturas muchas veces son cortadas o mutiladas de los bastidores de los retablos, por lo que los ladrones dejan restos de ellas en los bastidores. A objetos litúrgicos, como las custodias, es frecuente que se les intercambien las piezas o se ensamblen éstas de diferente manera, con la idea de que se vean distintos a los robados. Por ello es importante que cuando se cataloguen cálices, copones y custodias se tomen fotografías de cada una de las partes, se recomienda que éstas sean por separado con la idea de saber cuántos elementos conforman el objeto. La misma situación se puede presentar en esculturas que tienen elementos móviles como alas o atributos, en donde se intercambian las partes para pasar desapercibidas.

México ha reportado a Interpol algunas piezas arqueológicas e históricas robadas de nuestro territorio, en el caso de las históricas se han hecho denuncias entre los años 1997 al 2010, en el año 2001 se hicieron el mayor número de denuncias con 22 eventos. Es el Estado de Tlaxcala el que ha tenido robos en todos los años desde 1997 hasta el 2010 con excepción del 2002.

Es de extrañar que después del 2010 no exista información, a pesar de que sabemos que han existido robos en los años subsecuentes [10]. Lo que habla de la falta de continuidad en los procesos para la recuperación del patrimonio cultural, al resguardo de las asociaciones religiosas y las comunidades, por parte de las instituciones encargadas como INTERPOL México, la actual FGR y el INAH.

Gráfica II Tipología de las obras reportadas como robadas. Base de datos de obra robada en México (Interpol 2022).

Éste es el panorama al que se enfrentan los restauradores que son nombrados como peritos por el ministerio público. Cuando la policía cibernética localiza un objeto que fue reportado como robado se lo notifica a la policía quien hace las averiguaciones para poder determinar junto con el ministerio público si se sospecha que se trata del objeto robado. El proceso de identificación parte de la investigación inicial, que comienza con la presentación de la denuncia y concluye cuando el imputado queda a disposición del Juez de control para que se le formulen cargos [11]. En esta fase inicial en la que el M.P solicita apoyo de peritos, a través de jurídico del INAH, para que identifiquen y autentiquen el bien cultural en cuestión, y determinen si se trata de un monumento conforme a la ley. En estos dictámenes periciales es necesario responder a las preguntas que formula el M.P sobre el origen y la procedencia de los bienes, es decir, demostrar el objeto y su relación con el lugar de donde fue robado. En resumen, se autentifica el objeto.

Muchas veces el ministerio público pone a disposición de los peritos restauradores fotografía del objeto en venta para que los peritos las comparen con fotografías del objeto antes del robo.

Para ello los restauradores comparamos principalmente los deterioros que tenían las piezas antes del robo, sus características formales y los materiales involucrados en su



Figura 1. Cambios en la imagen de la pintura antes y después del robo . Aparece un niño al centro de la imagen.

manufactura, así como la técnica con la que se realizó. Este primer peritaje le permite al ministerio público incautar la pieza para que pueda ser analizada por el restaurador perito. Cuando la pieza se pone a disposición de los peritos es analizada, se ve si existen daños o deterioros en ella. Una vez establecidos y ubicados los daños, modificaciones o alteraciones se hace un presupuesto sobre los costos que tendría la restauración del mismo. Para la realización de esto los restauradores, en colaboración con otros especialistas, llevan a cabo análisis técnicos, históricos y científicos

de distinta índole como pueden ser: fotografía con luz ultravioleta, fotografía con luz rasante, análisis químicos tanto cualitativos como cuantitativos, microscopía electrónica, etc. Otro de los elementos que es necesario revisar es la técnica de manufactura, en el caso de pinturas de caballete es necesario determinar el número de lienzos que conforman a la obra, es decir el número de fragmentos de tela que fueron unidos para conformar una pintura de grandes dimensiones. En contadas ocasiones las uniones de las telas se marcan en la capa pictórica, estas marcas son únicas en la obra. Por lo



Figura 2. Intercambio de piezas en una custodia. Se cambian las piezas que conforman los objetos litúrgicos. Observar que la peana, cuello y base son diferentes en la última imagen.

que estas huellas sirven para determinar que la obra robada es la recuperada en los casos en que se identifiquen estas huellas. La pérdida de capa pictórica en áreas puntuales, así como manchas por humedad en el reverso del lienzo deben analizarse ya que son huellas que ayudan a la identificación y para poder determinar la similitud entre las obras robadas y las recuperadas. Los deterioros de una pieza son únicos y hablan de los cambios y modificaciones que ha sufrido la obra a lo largo del tiempo.

El estado de los materiales, así como la técnica, también dan fe de la autenticidad y antigüedad de la obra [12]. En algunos casos se puede observar el barniz de tonalidad amarillenta y el patrón de craquelado, producto de la oxidación continua y natural de los aglutinantes.

Todos estos análisis junto con las características materiales, técnicas y formales permiten al restaurador determinar si se trata de la misma obra robada o no.

Muchas veces las intervenciones que estas piezas tienen nos permiten suponer que fueron robadas, como son bandas y reposiciones en todos los costados de las pinturas. Esto nos habla de que fueron cortadas de sus lugares originales. Por otro lado, las leyendas, inscripciones y firma del autor constituyen un importante elemento para el reconocimiento de una obra. En el caso de firmas es necesario analizar el trazo caligráfico que debe ser idéntico a las inscripciones presentes en las imágenes del registro del cuadro. En este punto es además necesario compararla con otras firmas del autor. A su vez, la luz ultravioleta puede ayudar a establecer si la firma de una obra es auténtica o no.

Una de las problemáticas para la recuperación de nuestro patrimonio a los que nos enfrentamos es que no siempre se hace la denuncia de las piezas robadas. En muchos países no existe una cultura de la denuncia, por lo que las denuncias por robo o daño de bienes culturales son bajas. En general, es muy común que las personas crean que las denuncias deban ser realizadas por una autoridad, sin embargo, la denuncia por robo o daño puede ser presentada por cualquier persona. En otros casos tienen miedo de ser inculcados por la policía. A nivel internacional México tiene que comprobar que las piezas salieron de su territorio, por lo que en el caso de bienes arqueológicos es difícil poderlo justificar si no hay una denuncia de saqueo. Cuando se tratan de recuperar

piezas que están vendiendo en Europa nos enfrentamos a una regulación deficiente del tráfico ilícito de bienes culturales, un proteccionismo de las naciones europeas y lo que se denomina presunción de buena fe. Para los países como México que sufren el saqueo de su patrimonio, esta disposición es errónea y atenta a la soberanía de un Estado que reclama la propiedad cultural de un bien sacado en forma ilegal de su territorio. El principio de “compra de buena fe”, se contrapone al derecho de un país sobre sus propiedades. No olvidemos que la mayoría de los bienes traficados son adquiridos por casas de subastas, galerías y museos, que no se aseguran de la procedencia lícita de los bienes.

En el país, con relación al patrimonio arqueológico e histórico, existe el Sistema Único de Registro Público de Monumentos y Zonas Arqueológicas e Históricas. Sin embargo, no todo nuestro patrimonio cultural se encuentra registrado. En muchos casos no se cuenta con inventarios y catálogos con información del objeto o hay tan solo fotografías parciales de las obras o de mala calidad, por lo que en algunos casos hay que recurrir a fotografías antiguas proporcionadas por las comunidades o autoridades. En otros casos las fichas cuentan con información errónea o tan general que se dificulta la identificación del objeto. También existen en este sistema registros de falsificaciones como es el caso de algunas piezas que se encuentran en museos o bodegas nacionales.

A su vez algunas instituciones como el Instituto Nacional de Bellas Artes y Literatura no cuentan con personal especializado para realizar peritajes sobre bienes artísticos. Mientras que otras instituciones a pesar de contar con los especialistas en distintas áreas culturales, ellos no realizan las labores de peritajes.

Para Ernesto Becerril el tráfico ilícito de bienes culturales es un fenómeno complejo que constituye un reto para las políticas públicas y legislación en materia de Patrimonio Cultural [13]. En este sentido, es importante que México cuente con políticas públicas, programas, proyectos y manuales de procedimientos que involucren a las distintas instituciones avocadas a la persecución del delito, conservación y recuperación de los monumentos en caso de robo y tráfico ilícito. Asimismo, las instituciones tienen que trabajar coordinadamente ya que en general se ha detectado falta de acuerdos y comunicación estrecha entre las diferentes instancias involucradas en la protección del patrimonio cultural.

Es importante que las instituciones cuenten con programas permanentes de capacitación de su personal para la identificación de nuestro patrimonio cultural, así como, de programas educativos de sensibilización a la población, con el fin de valorar el patrimonio. Es necesario realizar material didáctico para capacitar a las autoridades en las aduanas y actualizar la lista roja de México del ICROM conforme a cómo cambian los gustos de los coleccionistas internacionales.

Debe existir un trabajo permanente interinstitucional entre la Secretaría de Cultura a través del INAH y del INBA; la Interpol México y la Interpol Internacional, la Fiscalía General de la República, la Secretaría de Hacienda, a través

Tabla I. Tipología de las obras reportadas como robadas. Base de datos de obra robada en México (Interpol 2022).

Tipo de objeto	#
Pintura de caballete	149
Escultura	101
Objeto litúrgico	5
Documento	70
Mobiliario	1
Total	325

del SAT con las aduanas, la Secretaría de Gobernación con el Archivo General de la Nación, la Comisión del Episcopado Mexicano, la Secretaría de Relaciones Exteriores, la Guardia Nacional con su Gendarmería de Tutela del Patrimonio Cultural y el Poder Judicial.

Instituciones como el INAH, INBA y el AGN deben capacitar a sus profesionistas para que realicen peritajes y avalúos para la recuperación de nuestro patrimonio arqueológico, histórico, paleontológico, documental y artístico.

Es necesario que las autoridades encargadas de perseguir y coadyuvar en la prevención del delito trabajen coordinadamente para poder contar con una base de datos de obra robada a nivel nacional que pueda ser utilizada por

las instituciones y los peritos para incidir en la protección y recuperación del patrimonio histórico. Es importante que las autoridades trabajen coordinadamente con Interpol Internacional para que la base de obra robada de México se actualice permanentemente, sólo en la medida que esto se haga, la recuperación de nuestro patrimonio robado será posible.

Las instituciones y las comunidades deben trabajar en aumentar la seguridad en los inmuebles que resguardan el patrimonio cultural y contar con su identificación. Sólo en la medida de que conozcamos la cantidad y calidad que tienen nuestros bienes culturales podremos recuperarlos.

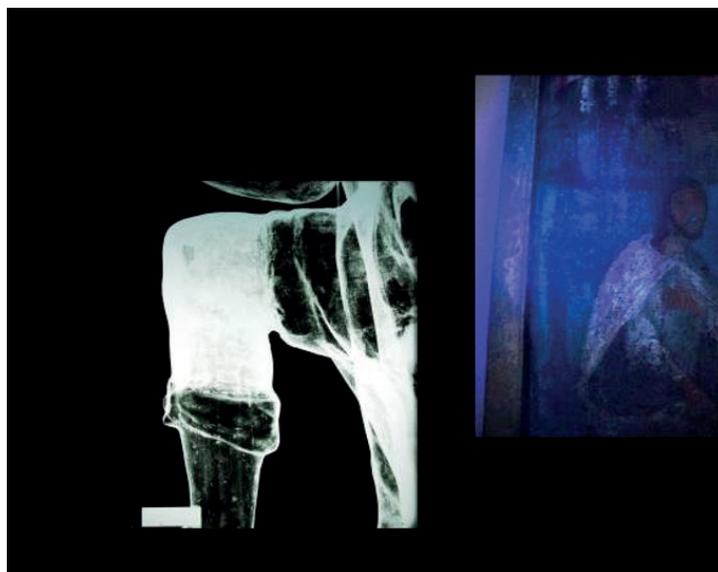


Figura 3. Análisis con luz ultravioleta en una pintura de caballete en donde se ven repintes que florecen de forma diferente al original y radiografía en escultura para ver técnica de factura, en donde se aprecian las partes que la conforman.

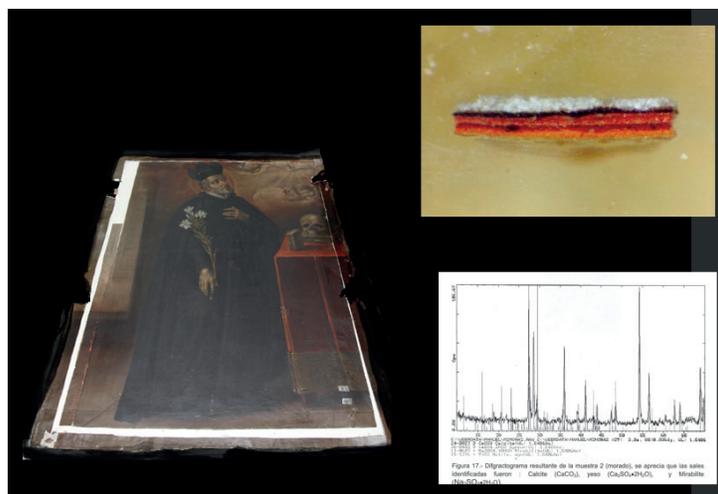


Figura 4. Difracción de rayos x y estratigrafía en una pintura de caballete, para comparar la pintura robada y los restos que quedaron en el bastidor después del robo.

Referencias

- Martínez, A. (1996) El patrimonio arqueológico de México, *Arqueo Mex.*, **21**, 6-13.
- Art Loss Register(2018) <http://www.artloss.com> (último acceso: 12 de 08 de 2018).
- Becerril, E. (2016) *The Necessary Evolution of the Mexican Law Under the New Paradigm of the 1972 UNESCO Convention in order to Strengthen The Fight Against the Illicit Trafficking of Cultural Property*. UNAM, Instituto de Investigaciones Jurídicas, México
- Carrillo, A. (1946) *Técnica de la pintura de Nueva España*, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Estéticas. México-
- Consejo Internacional de Museos (ICOM), Base de datos de Listas Rojas. s.f. <https://icom.museum/es/recursos/red-lists/?material=370&-type=391&country=462> (último acceso: 28 de 01 de 2023).
- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos [CPEUM], Reformada, Diario Oficial de la Federación (DOF), 5 de febrero de 1917, (Mex.).
- Código Nacional de Procedimientos Penales [CNPP], Reformado, Diario Oficial de la Federación (DOF), 5 de marzo, 2014 (Mex.).
- El Universal (2011) Roban 2 mil 655 piezas religiosas o de museo de 1997 a 2010: INAH. *El siglo de Torreón*. <https://www.elsiglodetorreon.com.mx/noticia/2011/roban-2-mil-655-piezas-religiosas-o-de-museo-de-1997-a-2010-inah.html?from=old> (último acceso: 29 de 01 de 2023).
- Pérez, M. (1998) El patrimonio cultural de México, *Alteridades*, **8**, 183-186.
- Instituto Nacional de Antropología e Historia (2016) Robo de monumentos históricos muebles en recintos religiosos de 2016 en el estado de Puebla, Portal de Transparencia del Gobierno de México.
- INTERPOL (2017) Creación de una unidad nacional especializada en patrimonio cultural. [file:///C:/Downloads/WOA_CreatingNational-CulturalHeritageUnit_brochure_2019-01_SP%20\(4\).pdf](file:///C:/Downloads/WOA_CreatingNational-CulturalHeritageUnit_brochure_2019-01_SP%20(4).pdf) (último acceso: 21 de 05 de 2022) Morales. M & Schmeits. K (2017) Campaña de la Coordinación Nacional de Conservación del Patrimonio Cultural para la prevención de robo y tráfico ilícito de bienes culturales, *Correo del rest.*, **18**, 39-52
- La Redacción (2006) Devuelve EU pintura del siglo XVIII robada en México. *Proceso*, <https://www.proceso.com.mx/cultura/2006/8/24/devuelve-eu-pintura-del-siglo-xviii-robada-en-mexico-46347.html> (último acceso: 28 de 04 de 2023).
- Williams, J. (1980) Los delitos en la ley federal sobre monumentos, Arqueología y Derecho en México, 93-112



RESTAURADORA MARTHA ISABEL TAPIA GONZÁLEZ

Es licenciatura en Restauración de Bienes Muebles por la Escuela Nacional de Conservación, Restauración y Museografía del INAH. Recibió formación en el International Center for the Study of Preservation and Restoration of Cultural Property en especializaciones sobre Tecnología y Conservación de piedra y Conservación Preventiva: Reducción de Riesgos en Colecciones. Maestrante en Cultura Mexicana: Teología y Pastoral con especialización en Dirección y Conservación Patrimonial por la Univ. Anáhuac. Desde 1985 es docente de tiempo completo en ENCRyM del INAH. Ha sido conferencista del Foro Nacional para el Combate al Tráfico Ilícito de Bienes Culturales en Honduras y en el Taller Regional sobre Fortalecimiento de Capacidades y Sensibilización para la Lucha contra el Tráfico Ilícito de Bienes Culturales en Lima, Perú.

Ha realizado peritajes en restauración para la Fiscalía General de la República.

Autora de artículos como el Tesoro de bienes muebles e inmuebles por destino de recintos religiosos y el libro sobre La Identificación de Bienes Culturales al Resguardo de la Iglesia.

De 2011 a 2018 y del 2021 a la fecha es Miembro titular del Consejo de Conservación-Restauración de Monumentos Muebles y adosados a la arquitectura del INAH.

Se ha desempeñado como asesora en países como Chile, Jamaica, República Dominicana y República de Nicaragua sobre conservación y restauración de obra. Ha impartido diversos cursos en países como: Chile, Costa Rica, Jamaica, Nicaragua y Panamá.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

REQUISITOS

Los manuscritos propuestos deberán de cumplir con las siguientes características:

- Ser manuscritos originales e inéditos, no remitidos a otra revista.
- Todo material aceptado para su publicación quedará como propiedad de la revista Mensaje Bioquímico.
- Los manuscritos deberán ser enviados a cualquiera de las direcciones de correo electrónico señaladas por el Comité Editorial en la carta invitación.

FORMATO

Formato del Manuscrito

Los trabajos constarán de un mínimo de 20 cuartillas, y un máximo de 30, incluyendo: carátula, resúmenes, manuscrito, tablas, cuadros, figuras, referencias y semblanza con foto.

Carátula

- Título en español e inglés máximo 15 palabras, no incluir abreviaturas o siglas.
- Nombre completo de los autores, comenzando por quien presentará el trabajo (apellido paterno, materno y nombre).
- Departamento de adscripción, institución de procedencia y dirección física.
- Datos de correspondencia: dirección electrónica y teléfono.

Resúmenes

- En español e inglés (No utilizar abreviaturas ni citar referencias).
- Extensión máxima de media cuartilla, cada uno.
- Palabras clave en español e inglés (máximo 6).
- Resumen gráfico (imagen gráfica del texto).

Texto

- Tipo Times New Roman a 12 puntos, con espacio de 1.5, a renglón seguido, en procesador de textos computarizado (WORD), empleando los criterios estándar del mismo procesador, como es margen y tamaño de hoja carta.

- Los nombres genéricos, fórmulas químicas, posología y vías de administración, indicados y expresados conforme la nomenclatura internacional.

Ilustraciones

- Un máximo 12 (cuadros, esquemas, figuras y fotografías).
- Figuras homogéneas con números arábigos progresivos de acuerdo con el orden de aparición en el texto, deben tener títulos y pie de figura.
- Tablas homogéneas identificadas con números arábigos, progresivos, de acuerdo con el orden de aparición en el texto, encabezadas por un título y cuya información no se repita en el texto.
- Las figuras deben ser enviadas en formato JPEG con una resolución mínima de 300 dpi atendiendo a las siguientes indicaciones:

Las imágenes a color se requieren en modo RGB (para su visualización a color en su formato online).

En caso de tratarse de imágenes donde sólo haya diferentes tonos de gris o gráficos en blanco y negro, deberán guardarse en modo “Escala de grises” ó “Blanco y negro”, según corresponda.

Las imágenes deberán estar recortadas y cercanas al tamaño que se desean. Los tamaños estándar para el ancho de las figuras son a una columna (7.2 cm) y a dos columnas (15.6 cm).

En caso de aparecer texto, asegurarse que sea legible en el tamaño que se desea (mínimo 8 puntos).

Todas las figuras y tablas que no sean de su autoría deberán de ir referenciadas o con el permiso correspondiente.

Para el resumen gráfico, se mantienen los mismos requerimientos de resolución. Este puede ser una figura del mismo texto modificada con el objetivo de impactar en el lector de manera creativa y fácil. El resumen gráfico sólo aparecerá en la versión electrónica del artículo.

Referencias

- Máximo 100, numeradas en orden progresivo.
- Las citas de las referencias dentro del texto deberán aparecer

entre paréntesis cuadrados.

- Para las referencias de artículos se utilizará el formato establecido por The Journal of Biological Chemistry, se anexan ejemplos:

Artículos

MacDonald, G. M., Steenhuis, J. J. y Barry, B. A. (1995) J. Biol. Chem. 270, 8420-8428.

Libros

López, CC. El razonamiento médico. Madrid, España: Ed. Díaz de Santos; 1994.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Capítulos de libro

Anspaugh S. Educating library users in two-years higher education institution. En: John Lubans Jr, editor. Educating the library user. New York, USA: RR Bowker Company; 1974. P. 69-82.

Libro electrónico

Montero, M., & Sonn, C. C. (Eds.). (2009). Psychology of Liberation: Theory and applications. doi: 10.1007/978-0-387-85784-8

Artículo de periódico en línea

Duhigg, C. (12 de septiembre de 2009). Toxic waters: Clean Water laws are neglected, at a cost in human suffering. The New York Times. Recuperado de <http://www.nytimes.com/2009/09/13/us/13water.html?em>

Informe gubernamental

Federal Interagency Forum on Child and Family Statistics. (2011). America's children: Key national indicators of well-being, 2011. Washington, DC: U.S. Government Printing Office. Recuperado de http://www.childstats.gov/pdf/ac2011/ac_11.pdf

Sitio web

Centre for Academic Writing (2006). The List of References Illustrated [en línea]. Disponible en: <http://home.ched.coventry.ac.uk/caw/harvard/index.htm> [20 Julio 2006]

Semblanza con foto

Deberá ser de media cuartilla con las mismas características de formato del manuscrito. La fotografía deberá ser en formato JPEG con una resolución mínima de 300 dpi. En caso de no recibir una imagen o la enviada no corresponda con el expositor, el Comité Organizador se reserva el derecho a obtener una imagen de la web ó dejar el espacio en blanco.

Notas adicionales

- No utilizar pies de página.
- No numerar las páginas.
- Evitar el uso de hipervínculos hacia sitios web.

PROCESO EDITORIAL

Después de enviar su trabajo a la dirección electrónica donde se recibió la invitación a participar, se enviará al Comité Editorial para su revisión. Al terminar este periodo, un miembro del comité le hará llegar su escrito con las observaciones pertinentes. Terminado el periodo de revisión, se elaborará la prueba de galera correspondiente para su aprobación final por parte del autor. Una vez autorizado el manuscrito final, no podrán hacerse correcciones ó enmiendas.

CONSIDERACIONES FINALES

Por tratarse de un evento académico, desarrollado con el único fin de difundir los avances de las ciencias bioquímicas, es de hacer notar que ni los conferencistas ni el Comité Editorial RECIBEN REMUNERACIÓN ALGUNA POR SU TRABAJO.

Es importante aclarar que aquellos trabajos que no cumplan con los requisitos solicitados, así como con el tiempo de entrega, NO SERÁN PUBLICADOS en el Mensaje Bioquímico.



Versión electrónica en <http://biosensor.facmed.unam.mx>



MENSAJE BIOQUÍMICO

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

REQUIREMENTS

Proposed manuscripts must fulfill the following requirements:

- They must be unpublished and original manuscripts, not considered for publication in other journals.
- All accepted material for publication will be the property of Mensaje Bioquímico.

Manuscripts must be sent to any of e-mail address specified by Editorial Board in the invitation letter.

FORMAT

Manuscript format

- Manuscript must be a minimum of 20 pages and a maximum of 30, including title page, abstract, manuscript, tables, figures, references and author's biographical note and photograph.

Title page

- Title in Spanish and English with a maximum of 15 words. Do not use acronyms or abbreviations.
- Authors' full names, beginning with the presenter author (last name and given name).
- Institution, department and address.
- E-mail address and phone number.

Abstract

- Must be in Spanish and English (without references and abbreviations).
- Maximum extension of half of one page, each.
- Key words in Spanish and English, maximum 6.
- Graphical abstract.

Text

- 12-points Times New Roman with 1.5 line spacing, in a computerized text processor (WORD) using default margin and page settings.
- Generic names, dosage and administration routes of drugs or chemicals substances must be indicated and expressed according to the international nomenclature.

Pictures

- Maximum 12 (including tables, figures and pictures).
- Figures must be identified with progressive Arabic numerals according to their appearance in the text and must contain a caption and a brief explanation.
- Tables must be identified with progressive Arabic numerals according to their appearance in the text and must contain a caption whose information should not be repeated in the text. All figures including the graphical abstract must be sent in JPEG format with a minimum resolution of 300 dots per inch (DPI) attend to the following indications:

Color images must be in RGB mode (for right visualization in the on line format).

For black and white graphics or images in gray scale, they must be saved as "black and white" or "gray scale".

Image size must be cropped and close to the actual size in the article. Standard width sizes for one column and two columns are 7.2 and 15.6 cm respectively.

Please note that if the picture includes any text, it should be at least 8 points in order to be clear.

Selected figure for graphical abstract can be creatively modified in order to impact to the reader.

All figures and tables that have been taken from another source must be adequately referenced and with author's permission.

For the graphic summary, the same resolution requirements are maintained. This can be a figure of the same modified text with the objective of impacting the reader in a creative and easy way. The graphic summary will only appear in the electronic version of the article.

References

- Maximum 100, numbered in progressive order.
- Citations inside the text must appear in square brackets.
- Citation format must be according to The Journal of Biological Chemistry, as follows:

For articles

MacDonald, G. M., Steenhuis, J. J. y Barry, B. A. (1995) J. Biol. Chem. 270, 8420-8428.

For books

López, CC. El razonamiento médico. Madrid, España: Ed. Díaz de Santos; 1994.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Book chapters

Anspaugh S. Educating library users in two-years higher education institution. In: John Lubans Jr, editor: Educating the library user. New York, USA: RR Bowker Company; 1974. P. 69-82.

Electronic book

Montero, M., & Sonn, C. C. (Eds.). (2009). Psychology of Liberation: Theory and applications. doi: 10.1007/978-0-387-85784-8.

Online newspaper

Duhigg, C. (12 de septiembre de 2009). Toxic waters: Clean Water laws are neglected, at a cost in human suffering. The New York Times. Retrieved from <http://www.nytimes.com/2009/09/13/us/13water.html?em>

Government report

Federal Interagency Forum on Child and Family Statistics. (2011). America's children: Key national indicators of well-being, 2011. Washington, DC: U.S. Government Printing Office. Retrieved from http://www.childstats.gov/pdf/ac2011/ac_11.pdf

Web site

Centre for Academic Writing (2006). The List of References Illustrated [online]. Available from <<http://home.ched.coventry.ac.uk/caw/harvard/index.htm>> [20 July 2006]

Biographical sketch with picture

Must be of half of a page with the same characteristics of the manuscript. Picture should be in JPEG format, with a minimum resolution of 300 DPI. If Editorial Board does not receive an adequate photograph, they will decide if the reserved space should be empty or they will take any satisfactory speaker picture from the web.

Additional notes

- Do not use footers.
- Do not use page numbering.
- Avoid the use of hyperlinks.

REVISION PROCESS

After submission the manuscript will sent to the Editorial Board for review. After this, one member of the Editorial board will send you the paper including suggestions and comments. After review, proof correction will be sent to author for final approval. The final manuscript cannot be modified in any way.

FINAL CONSIDERATIONS

For being an academic event developed with the unique proposes to transmit the advances of the Biochemical Sciences, should be noted that neither the speakers nor the editorial board **SHOULD RECEIVE ANY REMUNERATION FOR THEIR WORK.**

It is important to clarify that those manuscripts that do not meet the requirements requested and delivery time, **WILL NOT BE PUBLISHED** in Mensaje Bioquímico.