



**Facultad de Medicina, UNAM
Departamento de Bioquímica**



Mensaje Bioquímico



Editores: J. Guevara, D. Matuz, H. Vázquez.

Vol. XXXVI, 2012

ISSN 0188-137X

MENSAJE BIOQUÍMICO

MENSAJE BIOQUÍMICO

EDITORES:

DR. JORGE GUEVARA FONSECA

M EN C DEYAMIRA MATUZ MARES

M EN C HÉCTOR VÁZQUEZ MEZA

ORGANIZADO POR :

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,

FACULTA DE MEDICINA, UNAM

VOL.: XXXVI

2012

5 de Junio de 2012 a 4 de Junio 2013

Mensaje Bioquímico

D.R. © 2012 por Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.
Facultad de Medicina

ISSN-0188-137X

Prohibida la reproducción parcial o total
Por cualquier medio sin la autorización escrita
Del titular de los derechos patrimoniales

Impreso y hecho en México
Printed and made in Mexico

ÍNDICE

EDITORIAL	VII
AGRADECIMIENTOS	XI
PROGRAMA	XII
Evolución del TAB y del AMPc a lo largo de 40 años Raquel Guinzberg Perrusquía, María Magdalena Vilchis Landeros y Enrique Piña	1
Papel de la cardiolipina en la transición de la permeabilidad mitocondrial y el daño por reperfusión. Edmundo Chávez Cossio, Hernández-Esquivel, Natalia Pavón	15
Transporte de taurina a través de la barrera Hematoencefálica. Héctor Rasgado Flores	27
Metabolismo del zinc y las metalotioneínas en los procesos quirúrgicos. Eduardo Brambila Colombres	39
Regeneración tisular: el papel de la célula madre en las enfermedades cardiovasculares. Felipe Alonso Massó Rojas, Araceli Páez Arenas, Elvira Varela López, Luis Felipe Montaña Estrada, Salomón Desideri Hernández, Valentín Herrera Alarcón, Nydia Ávila Vazzny, Rafael Vilchis y José Luis Aceves Chimal	51
La mitocondria en el centro del universo celular. Marietta Tuena Sangri y Concepción José-Nuñez	65
El plegamiento de las proteínas in vitro e in vivo. Armando Gómez Poyou	82
Señales de cardioprotección en el corazón post-isquémico. Sauri Hernández-Reséndiz, Mabel Buelna-Chontal, Francisco Correa, Alejandro Silva y Ana Cecilia Zazueta Mendizabal	95
Estructura y mecanismo de la nueva subunidad inhibitoria ζ del nanomotor F_1F_0 ATP sintasa de las α -proteobacterias en <i>Paracoccus denitrificans</i> . José de Jesús García Trejo, Mariel Zarco Zavala y Edgar Morales Ríos	106

La inflamación como un factor clave para desencadenar la neurodegeneración Alfonso Díaz, Jorge Guevara , Blanca Espinosa, Raúl Chávez y Daniel Limón	127
Don José Laguna García, el “Maistro Laguna”. Antonio Peña Díaz	138
Evasión de la respuesta celular por el virus de Parotiditis de cepas vacunales. Nora Rosas Murrieta, Gerardo Santos Lopez, Julio Reyes Leyva y Irma Herrera Camacho	153
Agentes y mecanismos neuro-protectores relacionados con el estrés oxidante en el infarto cerebral. Camilo Ríos Castañeda	171
Epigenética, la otra cara de la genética. Raúl N. Ondarza	200



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVI, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

EDITORIAL

“....resulta que los objetos tienen sombra, pero también los sentimientos y los recuerdos...”
Felisberto Hernández, 1942.

El Mensaje Bioquímico es la sombra que acompaña desde 1972 al Taller de Actualización en Bioquímica (TAB). Este año en la versión XXXIX del TAB se edita el XXXVI volumen del Mensaje Bioquímico, que plasma las conferencias de los investigadores que como cada año han participado en el TAB, enriqueciendo nuestro interés por la Bioquímica. Este año el Mensaje Bioquímico está dedicado a la memoria del Dr. José Laguna García, quien fuera generador de una dinastía inagotable de bioquímicos. El Dr. Laguna al fundar el departamento de Bioquímica en la naciente Facultad de Medicina en Ciudad Universitaria y después como Director de la Facultad, cimentó junto a otros innovadores científicos, las bases de una bioquímica moderna y amalgamó las condiciones para transmitir, quizá otro más de sus logros, el interés para que muchos jóvenes estudiantes decidieran formarse en esta disciplina (tradicción que de manera exponencial han continuado sus alumnos), marcando una época relevante en el desarrollo de la Bioquímica en México. En esta edición del Mensaje Bioquímico, nos honran con su contribución algunos de sus alumnos y colaboradores, de los cuales mencionaré algunos de los comentarios del Dr Laguna sobre el trabajo específico de algunos de ellos.

Cuando se inició la Bioquímica en México fue la época de los hallazgos fundamentales de la Bioquímica moderna como el aislamiento de la coenzima A por Lipman y Kaplan, el papel de los nucleótidos en la biosíntesis de los carbohidratos y por Leloir, la función relevante de la mitocondria en el metabolismo y la fosforilación oxidativa por Lehninger y Kennedy, o la doble hélice para la estructura del DNA por Watson y Crick entre otros tantos hallazgos. En la Facultad de Medicina, junto al Dr. Laguna participaron los Dres. Jesús Guzmán, Carlos del Río, Raúl Ondarza y posteriormente Félix Córdoba, uno de los pioneros de la inmunquímica.

El campo de la bioenergética fue identificado como un punto toral por el Dr. Laguna quien afirmaba la destacada actividad científica que desarrollaban en el inicio de su carrera como investigadores independientes en Instituto de Biología en Departamento de Biología Experimental, Armando Gómez Puyou, Antonio Peña con Edmundo Chávez y Alfonso Cárabez¹. A continuación describió los aspectos mas

destacados del trabajo de algunos de sus alumnos, por ejemplo el Dr. Gómez Puyou se enfocó al estudio del papel de los catones en el mecanismo de transformaciones energéticas, lograron explicar el mecanismo molecular de la formación del ATP y que el transporte de iones juega un papel relevante en diversas reacciones celulares. Posteriormente la Dra Marietta Tuena demostró el efecto del ATP en la oxidación del succinato y con ello la relevancia de la succinato deshidrogenasa en el metabolismo intermedio. El Dr Chávez-Cossío identificó que la entrada de ATP a la mitocondria estaba controlada por la carga interna de este organelo y es simultáneo a la entrada de K⁺. Por su parte el Dr Antonio Peña aportó datos relevantes para postular la participación de un sistema de bombeo de H⁺ (y no de Na⁺) que genera el potencial electroquímico para el transporte de K⁺. El Dr. Enrique Piña identificó el mecanismo por el cual la glucosa-6-fosfato a inositol-1-fosfato, así como diversos mecanismos reguladores en la síntesis del inositol². La Dra. Victoria Chagoya, con el Dr. Laguna, identificaron mediante ensayos *in vivo* que la adenosina aumenta la carga energética y la biosíntesis, como la gluconeogénesis en el hígado, confirmando que la carga energética depende de la cantidad y proporción de nucleótidos adenílicos⁵. Para el Dr Laguna era claro que disciplinas como la farmacología y la inmunología tienen sólidas bases bioquímicas, ya que con los Dres. Juan Díaz Zagoya y Jesús Guzmán habían identificado el valor de la diosgenina en la regulación del metabolismo del colesterol⁶.

En este número homenaje al Dr Laguna, contribuyen algunos de sus alumnos y colaboradores y nos presentan resultados recientes de su trabajo. El Dr. Antonio Peña, narra de manera precisa algunos aspectos relevantes en la vida académica del Dr. Laguna, enfatizando el ingenio y las míticas anécdotas que caracterizaron a quien el Dr Peña llama como el “maestro Laguna”. El Dr Edmundo Chávez Cossio reporta que la transición de la permeabilidad mitocondrial está involucrada en el daño miocárdico por isquemia/reperfusión y evaluando la sensibilidad de los corazones de ratas hipotiroideas al daño por reperfusión, después de un periodo de isquemia muestran ausencia absoluta de arritmias, muy posiblemente por el bajo contenido de cardiolopina y de la adenina nucleótido translocasa, quienes podrían favorecer la resistencia al daño mitocondrial y miocárdico. El Dr. Armando Gómez Puyou hace un interesante análisis del plegamiento de las proteínas *in vitro* e *in vivo*, considerando que la expresión del código genético podría participar en la organización de los niveles estructurales terciarios y cuaternarios, basado en sus resultados en la expresión del gene de triosafosfato isomerasa humana al expresarse en una bacteria genera isoformas de la enzima debido posiblemente a un error en la traducción en un codón lo que enfatiza la relevancia de que un componente importante en el código genético involucra factores cinéticos. Las doctoras Marietta Tuena de Gómez Puyou y Concepción José-Nuñez hacen un interesante análisis de la función de la mitocondria y su relación con la regulación de la maquinaria epigenética y la expresión génica, así como su efecto primario sobre procesos patológicos o fisiológicos como el cáncer y el envejecimiento, respectivamente.

El Dr Raúl Ondarza presenta una revisión sobre la relevancia de la Epigenética, que nos permite identificar como participan diversos factores que pueden alterar drásticamente los cambios fenotípicos heredables. El Dr. Enrique Piña en colaboración con Raquel Guinzberg y Magdalena Vilchis, presentan resultados que confirman que la disposición de AMPc en zonas compartimentalizadas en microdominios de la

membrana, garantiza la velocidad en la respuesta y absoluta especificidad en la señal que genera al AMPc.

En esta edición contamos con la valiosa participación de la Dra. Nora Rosas Murrieta del Instituto de Ciencias de la BUAP, que presenta el análisis del efecto de las variantes de la proteína V del virus de la parotiditis parece tener un papel modulador sobre la apoptosis y la proliferación celular respecto y que jueguen en la patogénesis del virus. El Dr Felipe Massó Rojas del Instituto Nacional de Cardiología Dr. Ignacio Chávez, nos presenta resultados interesantes sobre el uso de células madres en la regeneración de tejido cardiaco posterior a accidentes vasculares, también nos presenta la evolución que ha tenido el uso de las células madre en la medicina regenerativa.

El grupo de la Dra. Sauri Hernández-Reséndiz, del Departamento de Bioquímica, del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, nos presenta sus resultados basados en el hecho que el corazón isquémico puede activar mecanismos endógenos de protección ante el daño por reperfusión, si se le acondiciona con periodos cortos de hipoxia y normoxia, e identifica que este acondicionamiento induce la activación de cascadas de señalización que son integrados por la mitocondria, determinando el destino final de la célula cardiaca.

También en el campo de la bioenergética la ATP sintasa es el nanomotor biológico ubicuo que produce la mayoría de la energía química que impulsa la vida en todas sus formas al sintetizar al ATP a partir del ADP y del Pi, El Dr. José J. García Trejo de la Facultad de Química de la UNAM y su grupo presentan evidencias bioquímicas y estructurales de un nuevo mecanismo de control del nanomotor F_1F_0 -ATP sintasa de las proteobacterias.

Contamos con la contribución de un importante investigador mexicano que radica en la Universidad Rosalind Franklin de Medicina y Ciencia de Chicago (notable también como músico y compositor), el Dr Hector Rasgado-Flores quien nos presenta los avances en su trabajo utilizando de manera separada membranas luminal and abluminal de la barrera hematoencefálica y como le permite caracterizar los sistemas que utiliza taurina para el transporte a través de esta barrera, lo que abre interesantes perspectivas para evaluar otros compuestos de potencial uso terapéutico.

El Dr. Alfonso Díaz nos presenta su trabajo sobre la inflamación cerebral y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson (EP) y Alzheimer (EA). Finalmente el Dr. Camilo Ríos nos hablará sobre los mecanismos y agentes neuroprotectores relacionados con el estrés oxidativo en el infarto cerebral.

Por último, contamos con la presencia de las empresas MERCK-MILLIPORE, ACCESOLAB, ASPELAB y ELSEVIER, que nos presentaran los avances del desarrollo de la tecnología al servicio de la investigación científica.

El desarrollo del Taller de actualización bioquímica se desarrolla con la decidida participación de sus organizadores, Jorge Guevara Fonseca, Deyamira Matuz Mares y Héctor Vázquez Meza, a quienes el Departamento de Bioquímica reconoce el gran

esfuerzo realizado en esta actividad, agradecemos también el apoyo del Dr. Enrique Graue Wiechers, Director de la Facultad de Medicina. En el aspecto administrativo el apoyo de los CP Pedro Hernández y Fernando Farfán y el apoyo de la Sra. Marivel Rojas y Rosa Ma. López ha sido invaluable.

Referencias

1. Peña A, Chávez E, Cárabez A, De Gómez-Puyou MT. (1977) Arch Biochem Biophys. 180 (2): 522-529. Pardo EG, Gomez-Poyou A, Ondarza R, **Laguna J.** (1955) *Acta Physiol Lat Am.* **5** (4):211-4.
2. Pardo EG, Gomez-Poyou A, Ondarza R, **Laguna J.** (1955) *Acta Physiol Lat Am.* **5** (4):211-4.
3. Laguna J, Hamabata A, Chagoya V. (1968) [Recent accomplishments in hormone biochemistry. II. Inhibition of the gluconeogenic effect of cortisol through the mediation of ribonucleic acid and its derivatives]. *Gac Med Mex.* **98**: 634-9.
4. Chagoya V, Hamabata A, Laguna J. (1967) Inhibition of gluconeogenic effects of cortisol by nucleotides and related substances. *Natl Cancer Inst Monogr.* **27**: 61-69.
5. Díaz Zagoya JC, Laguna J, Guzmán-García J. (1971) Studies on the regulation of cholesterol metabolism by the use of the structural analogue, diosgenin. *Biochem Pharmacol.* **20**(12): 3473-80.
6. Piña E, Hamabata A, Laguna J. (1962) Effect of low concentration of steroids on the activity of glycyglycine dipeptidase in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* **9**: 447-50.

Dr. Edgar Zenteno Galindo
Junio, 2012

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer el apoyo del **Dr. Enrique Luis Graue Wiechers**, Director de la Facultad de Medicina de la UNAM y del **Dr. Edgar Zenteno Galindo**, Jefe del Departamento de Bioquímica de esta misma facultad. De manera especial, agradecemos a la **Dra. María Leoba Castañeda Rivas** Directora de la Facultad de Derecho de la UNAM, por su apoyo en la disposición de la Aula Magna “Jacinto Pallares” donde se realiza por sexto año consecutivo el Taller de Actualización Bioquímica. Al mismo tiempo agradecemos el apoyo logístico al personal académico y administrativo de la Facultad de Derecho por las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones de dicha facultad.

Por la difusión oportuna del Taller de Actualización Bioquímica 2012 agradecemos al **Dr. Hugo E. Huitrón Vera**, Director de la Gaceta, UNAM, a la **Sra. Martha Marín Zapata**, Jefa del Departamento de Información y Prensa de la Gaceta de la Facultad de Medicina y al Personal a su cargo, en particular a la **Lic. Rocío Muciño Ramirez**. Además de todo el apoyo de la **Imprenta de la Facultad de Medicina** por la impresión de los posters y trípticos para la difusión de nuestro evento

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

Por último, queremos agradecer a las empresas patrocinadoras, que sin su apoyo no podríamos realizar el TAB: **MERCK-MILLIPORE, ACCESOLAB, ASPELAB y ELSEVIER**, quienes han brindado su apoyo para el desarrollo del Taller.

XXXIX TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna “Jacinto Pallares”, Facultad de Derecho, UNAM
30 y 31 de julio y 1 de agosto de 2012

Hora	Lunes	Martes	Miércoles
8:30-9:00	Inauguración		
9:00-10:00	Dr. Enrique Piña Facultad de Medicina, UNAM <i>Evolución del TAB y del AMPc a lo largo de 40 años.</i>	Dr. Marietta Tuena Sangri IFC, UNAM <i>La mitocondria en el centro del universo celular.</i>	Alfonso Díaz, Jorge Guevara, Blanca Espinos, Raúl Chávez, Daniel Limón B. Universidad Autónoma de Puebla <i>La inflamación como un factor clave para desencadenar la neurodegeneración</i>
10:00-11:00	Dr. Edmundo Chávez Cosío Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” <i>Papel de la cardiolipina en la transición de la permeabilidad mitocondrial y el daño por reperusión.</i>	Dr. Armando Gómez Poyou IFC, UNAM <i>El plegamiento de las proteínas in vitro e in vivo.</i>	Dr. Antonio Peña Díaz IFC, UNAM <i>Don José Laguna García, el “Maestro Laguna”.</i>
11:00-11:30	RECESO		
11:30-12:30	Dr. Héctor Rasgado Flores Rosalind Franklin University of Medicine and Science, USA. <i>Transporte de taurina a través de la barrera Hematoencefálica.</i>	Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizabal Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” <i>Señales de cardioprotección en el corazón post-isquémico.</i>	Dra. Nora Rosas Murrieta B. Universidad Autónoma de Puebla <i>Evasión de la respuesta celular por el virus de Parotiditis de cepas vacunales.</i>
12:30-13:30	Dr. Eduardo Brambila Colombres B Universidad Autónoma de Puebla <i>Metabolismo del zinc y las metalotioneínas en los procesos quirúrgicos.</i>	Dr. José de Jesús García Trejo Facultad de Química, UNAM <i>Estructura y mecanismo de la nueva subunidad inhibitoria ζ del nanomotor F_1F_0 ATP sintasa de las α-proteobacterias en Paracoccus denitrificans.</i>	Dr. Camilo Ríos Castañeda Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Agentes y mecanismos neuroprotectores relacionados con el estrés oxidante en el infarto cerebral.
13:30-15:00	COMIDA		
15:00-16:00	Dr. Felipe Alonso Massó Rojas Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” <i>Regeneración tisular: el papel de la célula madre en las enfermedades cardiovasculares.</i>	Millipore	Elsevier
16:00-17:00	Accesolab		Dr. Raúl N. Ondarza Facultad de Medicina, UNAM <i>Epigenética, la otra cara de la genética.</i>

XXXIX TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna “Jacinto Pallares”, Facultad de Derecho, UNAM
30 y 31 de julio y 1 de agosto de 2012

LUNES

8:30 Registro e Inscripciones

8:50 Inauguración

Conferencias

9:00-10:00

**Raquel Guinzberg Perrusquía, María Magdalena Vilchis
Landeros y Enrique Piña**

Facultad de Medicina, UNAM

“Evolución del TAB y del AMPc a lo largo de 40 años”

10:00-11:00

Edmundo Chávez Cossio, Hernández-Esquivel, Natalia Pavón

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

*“Papel de la cardiolipina en la transición de la permeabilidad mitocondrial
y el daño por reperfusión”*

11:30-12:30

Héctor Rasgado Flores

Rosalind Franklin University of Medicine and Science, USA

“Transporte de taurina a través de la barrera hematoencefálica”

12:30-13:30

Eduardo Brambila Colombres

B Universidad Autónoma de Puebla

Metabolismo del zinc y las metalotioneínas en los procesos quirúrgicos.

*“Regeneración tisular: el papel de la célula madre en las enfermedades
cardiovasculares”*

15:00-16:00

Felipe Alonso Massó Rojas, Araceli Páez Arenas, Elvira Varela

López, Luis Felipe Montaña Estrada, Salomón Desideri Hernández,

Valentín Herrera Alarcón, Nydia Ávila Vazzny, Rafael Vilchis y

José Luis Aceves Chimal

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

*“Regeneración tisular: el papel de la célula madre en las enfermedades
cardiovasculares”*

XXXIX TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna “Jacinto Pallares”, Facultad de Derecho, UNAM
30 y 31 de julio y 1 de agosto de 2012

MARTES

Conferencias

9:00-10:00

Marietta Tuena Sangri y Concepción José-Nuñez

IFC, UNAM

“La mitocondria en el centro del universo celular”

10:00-11:00

Armando Gómez Poyou

IFC, UNAM

“El plegamiento de las proteínas in vitro e in vivo.”

11:30-12:30

Sauri Hernández-Reséndiz, Mabel Buelna-Chontal, Francisco

Correa, Alejandro Silva y Ana Cecilia Zazueta Mendizabal

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

“Señales de cardioprotección en el corazón post-isquémico”

12:30-13:30

José de Jesús García Trejo, Mariel Zarco Zavala y Edgar

Morales Ríos

Facultad de Química, UNAM

*“Estructura y mecanismo de la nueva subunidad inhibitoria ζ del nanomotor F_1F_0 ATP sintasa de las α -proteobacterias en *Paracoccus denitrificans*”*

XXXIX TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna “Jacinto Pallares”, Facultad de Derecho, UNAM
30 y 31 de julio y 1 de agosto de 2012

MIÉRCOLES

Conferencias

9:00-10:00

Alfonso Díaz, Jorge Guevara, Blanca Espinosa, Raúl Chávez y Daniel Limón

B. Universidad Autónoma de Puebla

“La inflamación como un factor clave para desencadenar la neurodegeneración”

10:00-11:00

Antonio Peña Díaz

IFC, UNAM

“Don José Laguna García, el “Maestro Laguna”

11:30-12:30

Nora Rosas Murrieta, Gerardo Santos Lopez, Julio Reyes Leyva y Irma Herrera Camacho

B. Universidad Autónoma de Puebla

Evasión de la respuesta celular por el virus de Parotiditis de cepas vacunales.

12:30-13:30

Camilo Ríos Castañeda

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Agentes y mecanismos neuro-protectores relacionados con el estrés oxidante en el infarto cerebral.

16:00-17:00

Raúl N. Ondarza

Facultad de Medicina, UNAM

Epigenética, la otra cara de la genética.

XXXIX TALLER DE ACTUALIZACIÓN BIOQUÍMICA
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM
Aula Magna “Jacinto Pallares”, Facultad de Derecho, UNAM
30 y 31 de julio y 1 de agosto de 2012

Comité Organizador

Jorge Guevara Fonseca

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
jguevara@bq.unam.mx

Deyamira Matuz Mares

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
deyabq@comunidad.unam.mx

Héctor Vázquez Meza

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina, UNAM
hvazquez@bq.unam.mx

Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H
(eds.) **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVI**, Depto. de
Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional
Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF.
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVI, 1 – 14**, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

EVOLUCIÓN DEL TAB Y EL AMPc A LO LARGO DE 40 AÑOS

EVOLUTION OF THE TAB AND cAMP ALONG 40 YEARS

Raquel Guinzberg Perrusquía, María Magdalena Vilchis Landeros y Enrique Piña

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM,
Ciudad Universitaria, CP 04510, México D.F., México
epgarza@unam.mx

Resumen

Se rememora el origen de los Talleres de Actualización Bioquímica y los Mensajes Bioquímicos y la destacada participación que tuvieron para su realización inicial la Secretaría de Enseñanza del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y el Dr. José Laguna, director de la Facultad.

El AMPc es el segundo mensajero de muchas hormonas a nivel celular, sin embargo, da respuestas exclusivas a cada hormona promotora de su síntesis. Un avance para comprender este fenómeno es el reportado anclaje a proteínas “andamio” tipo AKAP, de enzimas que sintetizan, usan y degradan el AMPc, donde establecen microdominios en los que se difunde el AMPc. Este trabajo demuestra que el AMPc no difunde, no abandona el sitio específico de la membrana donde se sintetiza, así completa la compartimentalización de una señal y explica la precisión para dar una respuesta exclusiva propia a cada señal que los generó. Se aislaron membranas plasmáticas de hepatocitos (MPH), se estimularon selectivamente en sus receptores a la adenosina (Rado) A_{2A} y A_{2B} , se midió el AMPc sintetizado y la actividad de la

proteína quinasa activada por AMPc (PKA) y la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por el AMPc (Epac). Se identificaron dos complejos multiproteicos, un complejo responde exclusivamente a la estimulación del Rado A_{2A} y está compuesto por la adenilil cilasa (AC6) unida a la mAKAP, que en presencia de ATP y $GTP\gamma S$ sintetiza AMPc, el cual activa la PKA a una velocidad mayor a la que es degradado por la fosfodiesterasa (PDE) 3A. El otro complejo responde a la estimulación del Rado A_{2B} y está integrado por la AC5 unida a una AKAP no identificada, que sintetiza AMPc, el cual activa la Epac a una velocidad mayor a la que es degradado por la PDE3B. Después de la activación específica de cada complejo con su agonista selectivo, se observa que más del 99% del AMPc recién sintetizado permanece unido a la MPH ya que es recuperado en dichas membranas al ser centrifugadas, y no difunde al sobrenadante. En conclusión, la cinética del consumo del AMPc recién sintetizado en las MPH no corresponde al de una solución acuosa, si no al de un estado sólido. Sólo de esa manera se garantiza la velocidad en la respuesta y absoluta especificidad en la señal.

Palabras clave: AMPc, AKAP, PKA, Epac, Adenilil cilasa.

Abstract

The origin of the first up-to-date Biochemical Workshop (TAB) and the first Biochemical Memories of those TABs are remembered, as well as the pivotal role carried out by some professors from the Biochemical Department (School of Medicine, National University of Mexico), and the Dean of the School of Medicine, Professor José Laguna.

Numerous physiological messengers can generate cAMP as mediator of intracellular signal events, notwithstanding its responses are exclusive for each messenger accepted recognized by the cell. To decipher how a cAMP selects just one from many remarkable different functional outputs, a clue advance include the reported compartamentalization into scaffold proteins type, like AKAP ones, of enzymes with ability to generate, use and catabolize cAMP, thus generating microdomines where cAMP can spread. Here we show two natural functional protein complexes present in isolated plasma membranes from hepatocytes, that in response to A_{2A} or A_{2B} adenosine receptors (AdoR) generated a non-diffusible cAMP, that is not released from the place were it is synthesized, thereof definitively contributing to compartamentalize a sole proper response to each single signal. A_{2A} -AdoR responsive complex upon selective activation, and with the scaffolding provided by mAKAP, stimulates adenylyl cyclase (AC) 6 to synthesize cAMP which either activates cAMP-dependent protein kinase (PKA), or it is hydrolyzed by phosphodiesterase (PDE) 3A. Previous PKA activation with a selective cAMP analog prevented cAMP synthesis through AC6 activation by A_{2A} -Rado agonist. Likely, A_{2B} -Rado responsive complex upon selective activation stimulates AC5 to generate cAMP which either activates Epac, or it is hydrolyzed by PDE3B. Epac activation with its selective cAMP analog impaired cAMP synthesis through AC5 activation by A_{2B} -Rado agonist. A_{2A} selective agonist set its complex to generate cAMP synthesis 3.6-fold faster than cAMP catabolism, and A_{2B} selective agonist set synthesis 15-fold faster than catabolism. Thus, integrated and independent functional

microsystems incorporated in plasma membranes immobilized cAMP to insure its spatiotemporal control for each single activable effector.

Keywords: cAMP, AKAP, PKA, Epac, adenylyl cyclase

El primer taller de actualización bioquímica, el TAB, se gestó a finales de 1973 en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM. Entre los factores sociales que propiciaron el nacimiento de dicho taller se pueden citar algunos propios de esta Facultad, otros de las Universidades estatales y otros más relacionados con la situación prevalente en el mundo sobre la tecnología en informática. En la Facultad de Medicina de la UNAM, José Laguna García era el Director, y su empeño y dedicación por mejorar la enseñanza y el aprendizaje de la medicina se concretó en un conjunto de cambios favorables y una mística que marcaron un hito en la historia de la medicina en México.

Uno de dichos cambios incluyó el establecimiento de un Taller de Actualización Didáctica con duración de 40 horas, al que por muchos años en forma obligatoria deberían asistir los profesores de la Facultad. Para la realización de dichos Talleres se incorporaron a la Facultad un grupo de pedagogos, quienes además de dirigir los Talleres, asesoraban a los profesores de la Facultad en su actividad como docentes, una de las respuestas a la iniciativa anterior por parte de la entonces llamada Sección de Enseñanza del Departamento de Bioquímica, integrada en aquella época por Guillermo Álvarez Llera, Magdalena Carrillo Santín^(†) y Yolanda Saldaña Balmori, fue la de proponer una reunión de profesores de Bioquímica del país para intercambiar opiniones relativas a la enseñanza de la bioquímica, y sobre los mecanismos para que los profesores se actualizaran continuamente en una área de conocimiento con crecimiento exponencial.

La idea me pareció excelente y como Jefe del Departamento se la propuse al Director Laguna, quién de inmediato la acogió. En aquellos años Laguna era un participante activo de la Unión de Escuelas y Facultades de Medicina del País y conocía las carencias de las mismas, particularmente en relación con sus bibliotecas y hemerotecas y realmente nos apoyó. Recuérdese que no había Internet, ni estudios de posgrado fuera de la UNAM, ni directorio de profesores de bioquímica, ni profesores de tiempo completo fuera del Distrito Federal.

A través del correo ordinario y con la lentitud del mismo, la Sección de Enseñanza del Departamento inició la comunicación y la convocatoria para asistir al primer TAB, que se realizó del 25 al 29 de marzo de 1974 en el salón 2B, uno de los de Bioquímica de esta Facultad de Medicina, y cuya inauguración corrió a cargo del propio José Laguna. Con base en los datos de Yolanda Saldaña, asistieron a ese primer taller 64 profesores, entre ellos 22 de la provincia y 2 extranjeros. Para el cuarto taller, en 1977, el total de asistentes fue de 147, con 50 de provincia y 1 del extranjero. El quinto Taller, en 1978 se efectuó en Parras, Coahuila, bajo los auspicios de la Universidad de Coahuila y coincidió con la aparición del primer Mensaje Bioquímico, esto es un

volumen editado por miembros del Departamento de Bioquímica de la Facultad y con el concurso de profesores invitados.

Transcribo la primera parte del “Prólogo” preparado por los Editores (Saldaña, Álvarez Llera y Piña) del primer Mensaje Bioquímico: “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”.

Este año estamos realizando el XXXIX TAB que aparece en el volumen XXXVI del Mensaje Bioquímico. Si aceptamos unos 10 trabajos por cada uno de los Mensajes Bioquímicos publicados, tendríamos unos 360 trabajos de actualización reunidos en dichas obras. Además del intercambio de experiencias de los profesores que asisten al Taller y del toque pedagógico que inculcó Laguna y que tradicionalmente ha existido en el Taller y el Mensaje.

Antes de continuar con la segunda parte de mi presentación, que se refiere a la evolución del AMPc en los últimos 40 años quiero hacer un alto.

José Laguna decía que los mexicanos nos caracterizamos, entre otras cosas, por tener una gran iniciativa y poca “acabativa”: esto es iniciamos muchas buenas ideas, pero no acabamos ninguna, mucha iniciativa poca “acabativa”. Aquí quisiera reconocer la gran iniciativa de Guillermo Álvarez Llera, Magdalena Carrillo Santín y Yolanda Saldaña Balmori, quienes tuvieron una excelente iniciativa que llevaron a cabo con un éxito creciente tanto el desarrollo del TAB con el del Mensaje Bioquímico. Así desafiaron la máxima de José Laguna. Además, manifiesto mi reconocimiento al enorme esfuerzo de mi maestro, José Laguna, quien como hombre sabio de su tiempo apoyó el Taller de Actualización Bioquímica del que ahora disfrutamos, y quien promovió con energía a mejorar la enseñanza y el aprendizaje de la Medicina en México y así contribuyó eficientemente al sólido establecimiento de la “tradición científica” de este país.

Segunda parte. El miércoles 27 de marzo de 1974, en el primer TAB, Victoria Chagoya presentó una plática con el título “Hormonas, AMP Cíclico y Metabolismo Intermedio”. Hoy reviso brevemente con ustedes la propuesta que hace el grupo de investigación que trabaja conmigo para tratar de entender la funcionalidad del AMPc. El AMPc se descubrió en 1958 por Sutherland y Rall como un segundo mensajero producido en respuesta a la acción de una hormona [los datos de historia del AMPc aquí contenidos se tomaron de la publicación de Wong y Scott en 2004, referencia 1].

Ahora se sabe que la síntesis de AMPc en las células se inicia con la ocupación de un ligando a la proteína G acoplada al receptor (GPCR), la interacción es estereoespecífica.

El ligando y la GPCR catalizan el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de la proteína heterotrimérica G, subunidad que se disocia de las subunidades β y δ y activa a la adenilil ciclasa (AC) que convierte al ATP en AMPc. Al principio se consideró que el AMPc difundía libremente en un radio de 220 μm [cita 5 en referencia 1]. Con imágenes directas de las células se visualizó que el AMPc forma gradientes y se acumula en sitios específicos [cita 6 a 8 en referencia 1], desde 1980 se objetó, desde un punto de vista funcional, que el AMPc difundiera en la célula [2].

Cómo descifra la célula que el AMPc generado por la activación de un receptor adrenérgico ocasione una respuesta adrenérgica, no obstante que en esta misma célula otras hormonas pudieran generar AMPc. Sin embargo, no hay confusión, la respuesta es unívoca, sin errores de señalización. La siguiente etapa fue la demostración experimental de que los dominios donde difunde y actúa el AMPc se redujeron a 1 μm [3] y en general se aceptó que la actividad catalítica de las fosfodiesterasas (PDEs) destruiría el exceso de AMPc generado y se consideraron las enzimas más importantes para fijar los límites de los microdominios [4].

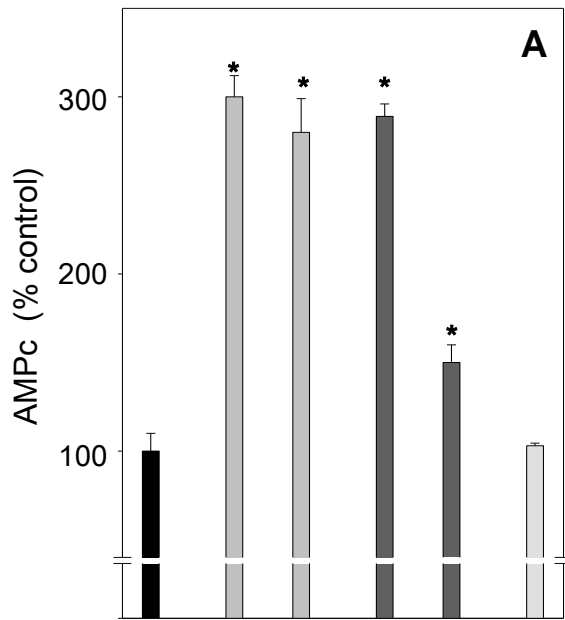
Un importante avance se obtuvo al descifrar las propiedades y características de las proteínas llamadas genéricamente AKAPs, siglas en inglés de la proteína que ancla a la cinasa A. Estas AKAP son proteínas identificadas como un andamiaje a las que se unen otras proteínas e integran un complejo multiproteico que compartimentaliza a las enzimas que sintetizan y que utilizan el AMPc. Así el AMPc es sintetizado por la adenilato ciclasa (AC) anclada al complejo, de donde difunde y activa a la proteína cinasa A (PKA), también anclada en la AKAP, y su difusión se limita por las fosfodiesterasas (PDEs) del complejo [5]. En este trabajo tratamos de demostrar que el AMPc generado en el complejo no difunde, y que en situación fisiológica, compiten por su uso las enzimas efectoras tipo PKA, con las enzimas que lo degradan, tipo PDEs. Deseo aclarar que ninguno de los experimentos aquí presentados los realicé físicamente. Participé en su diseño, y sobre todo, en el análisis de los resultados que aún no han sido publicados.

Incluyo un mínimo de antecedentes sobre el modelo experimental aquí usado. Nosotros hemos trabajado por más de 20 años con la adenosina como hormona y de sus acciones en el hígado de la rata. En este órgano se ha demostrado por técnicas genéticas y farmacológicas la existencia de 4 receptores para la adenosina, el A_1 el A_{2A} , el A_{2B} y el A_3 . La estimulación exclusiva de cualquiera de los dos receptores, el A_{2A} o el A_{2B} , realizado con el uso de agonistas y antagonistas selectivos, promueve en hepatocitos aislados un aumento del AMPc medible, una elevación en la concentración del calcio citólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) y un aumento en la velocidad de la ureogénesis, la gluconeogénesis y la glucogénesis [6,7].

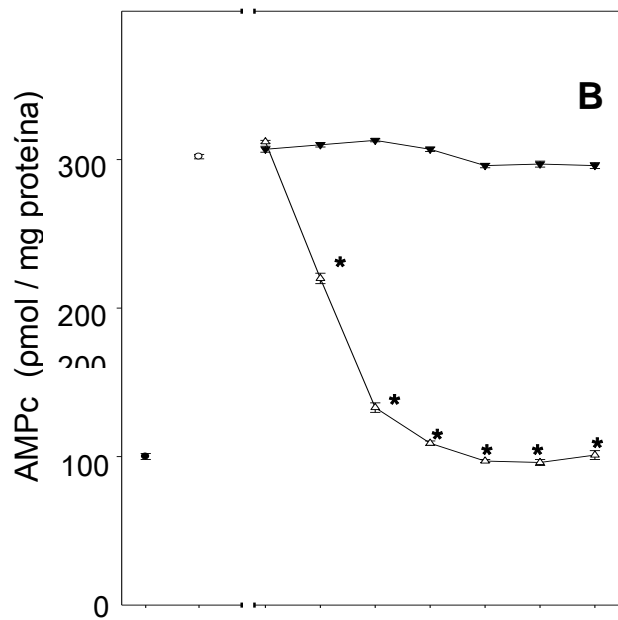
Usamos hepatocitos aislados de hígado de rata, separados por medio de elutriación de las otras estirpes celulares presentes en el hígado y lisados con una solución hipotónica. A través de una centrifugación diferencial preparamos membranas plasmáticas altamente enriquecidas (MPH) [8]. La incubación de esas membranas por 2 min con agonistas selectivos para los receptores de la adenosina (R_{ado}), A_{2A} o A_{2B} , sintetizan AMPc a partir de ATP y en presencia de $GTP\gamma S$, análogo no degradable del GTP (Fig. 1A). Esta respuesta a los R_{ado} se bloquea si se realiza la activación simultánea de ambos receptores (Fig. 1A), esto es, el fenómeno denominado “crosstalk” en inglés, se observa en las MPH y al inicio de la cascada de amplificación de la señal dada por la activación de los receptores. Por el uso de anticuerpos se realizó la identificación de las ACs responsables de la síntesis de AMPc en respuesta a la estimulación de los R_{ado} . Los anticuerpos contra la AC6 impidieron la síntesis de AMPc cuando se activaron los R_{ado} A_{2A} , de manera similar los anticuerpos contra la AC5 inhibieron la síntesis de AMPc cuando los R_{ado} fueron los A_{2B} (Fig. 1C).

En células del tejido cardiaco se ha mostrado que la AC5 está anclada en la llamada mAKAP [5]. Este y otros datos nos llevaron a explorar la participación de las denominadas proteínas de andamiaje, tipo AKAP, participando en la respuesta a la activación de los R_{ado} en las MPH. Para ello empleamos el péptido Ht-31 diseñado para separar por competencia a las proteínas que se anclan en la mAKAP [9]. La síntesis de AMPc se bloqueó cuando se incubó el péptido Ht-31 a las MPH estimuladas en sus R_{ado} A_{2A} , y no se modificó, si los R_{ado} estimulados fueron los A_{2B} (Fig. 1D). Estos resultados indican que la AC6 responde funcionalmente a la estimulación de los R_{ado} A_{2A} , solamente cuando se encuentran anclados en la mAKAP, pero se pierde la respuesta al no estar anclada a dicha proteína. Se desconoce hasta el momento la proteína de anclaje para la AC5.

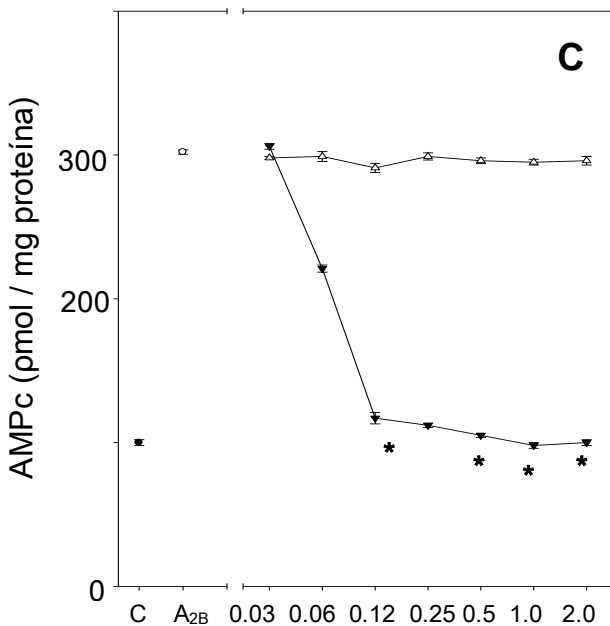
La siguiente etapa obvia era la demostración de que existiera en las MPH una proteína cinasa dependiente de AMPc con capacidad de ser activada. Los resultados muestran actividad catalítica de la PKA en la MPH si la mezcla de incubación es suplementada con AMPc exógeno o si el AMPc es generado por activación selectiva del R_{ado} A_{2A} , pero no si el AMPc fue generado por activación selectiva del R_{ado} A_{2B} (Fig. 1E). Además, el efecto del AMPc mediado por la activación del R_{ado} A_{2A} se abolió con el uso de H-89, la molécula inhibidora de la PKA [10] y el efecto no se observa al añadir BFA un inhibidor de la Epac [11] (Fig. 1E). Comparativamente, la presencia de la proteína Rap 1, la cual aparece cuando el AMPc activa la Epac, es generada cuando se estimula el R_{ado} A_{2B} (Fig. 1F). Estos últimos datos son importantes porque demuestran que el AMPc generado por la estimulación del R_{ado} A_{2A} se destina a la actividad de la PKA y no difunde hacia el sitio donde está la Epac ni ocasiona su activación, a pesar de encontrarse en la misma membrana. Lo mismo puede decirse en el sentido opuesto: la estimulación de R_{ado} A_{2B} genera AMPc exclusivo para activar Epac y no difunde para activar a la PKA, situado en la misma membrana.



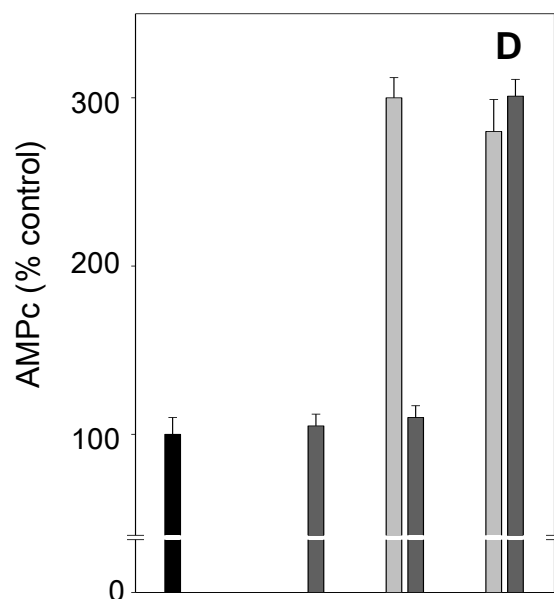
	1	2	3	4	5	6
CGS21680	-	+	-	-	-	+
NECA	-	-	+	-	-	+
DPCPX	-	-	+	+	+	+
CSC	-	-	-	-	+	-
Alloxazine	-	-	-	+	-	-
MRS1220	-	-	-	+	+	-



C A_{2A} 0.03 0.06 0.12 0.25 0.50 1.0 2.0
 anticuerpo [$\mu\text{g/ml}$]
 +
 Agonistas A_{2A} [10^{-6}M]



C
 A_{2B} 0.03 0.06 0.12 0.25 0.5 1.0 2.0
 anticuerpo [$\mu\text{g/ml}$]
 +
 Agonistas A_{2B} [10^{-6}M]



CGS21680	-	-	+	+	-	-
NECA	-	-	-	-	+	+
DPCPX	-	-	-	-	+	+
Ht-31	-	+	-	+	-	+

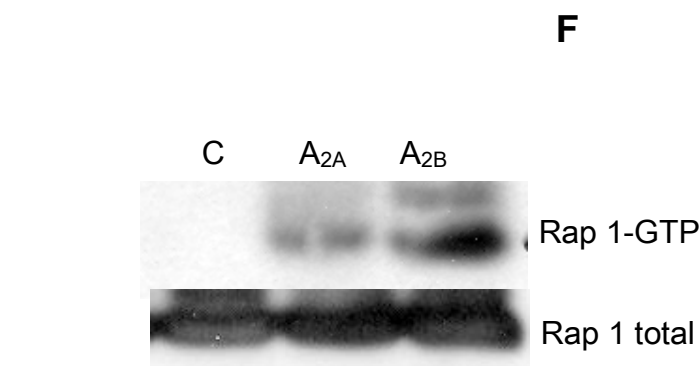
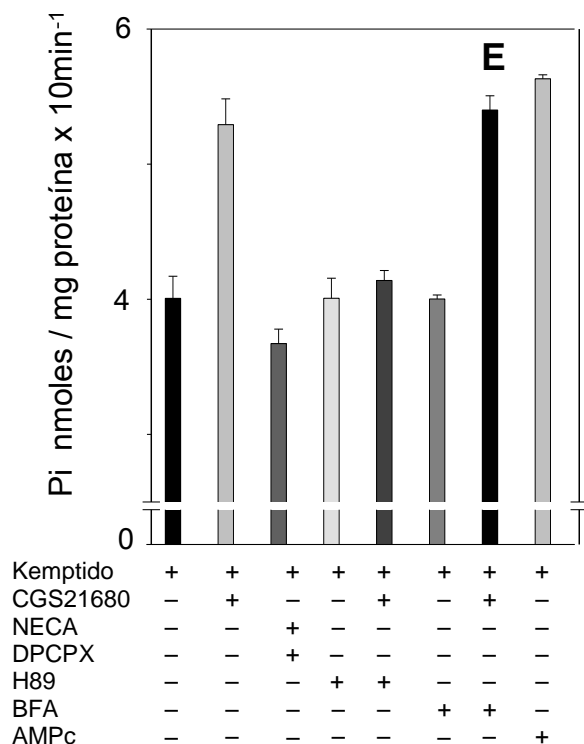


Figura 1 (A). Síntesis de AMPc en respuesta a la activación de los receptores de la adenosina A_{2A}, A_{2B} y ambos. Las membranas plasmáticas de hepatocitos (MPH) se incubaron a 37°C durante 2 min en Krebs-Ringer bicarbonato pH 7.4 suplementado con 1.2 mM CaCl₂, 100 μM GDPγS, 1 mM ATP y 1 μM de los agonistas o antagonistas para lograr la activación respectiva de los agonistas anotados: columna 1 ningún agonista, representa el valor control; columna 2:

activación de R_{ado} A_{2A} con agonista selectivo; columna 3 activación de R_{ado} A_{3A} con agonista de A_{2A} y A₁ junto con antagonista de A₁; columna 4 activación de R_{ado} A_{2A} con adenosina junto con 3 antagonistas para A₁, A_{2B} y A₃; columna 5 activación de R_{ado} A_{2B} con adenosina junto con 3 antagonistas para A₁, A_{2A} y A₃; columna 6 activación simultánea de los R_{ado} A_{2A} y A_{2B} con el tratamiento indicado para las columnas 2 y 3. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control, tomado como 100%. (B). Identificación de la adenilil ciclasa relacionada con el R_{ado} A_{2A}. Las condiciones experimentales para generar AMPc fueron las mismas que se incluyen en la Fig. 1A, columna 2 para activar el R_{ado} A_{2A} en todos los tubos, excepto el indicado con la letra C (control). A cada tubo se le añadió la cantidad de anticuerpo necesaria para alcanzar las concentraciones indicadas en la figura, ya sea contra la AC5 (▼), o la AC6 (△) como en la Fig. 1A. (C) Identificación de la adenilil ciclasa relacionada con el R_{ado} A_{2B}. Condiciones experimentales para generar AMPc como las anotadas en la Fig. 1A, columna 3. Anticuerpos AC5 (▼) y AC6 (△) como en la Fig. 1B. Otras indicaciones como en la Fig. 1A. (D). Efecto del péptido Ht-31 en la síntesis de AMPc obtenido como respuesta a la activación de R_{ado} A_{2A} (a la izquierda) o la R_{ado} A_{2B} (a la derecha). (E). Actividad catalítica de la PKA en MPH. Las membranas se mezclaron con 30 μl de buffer MOPS pH 7.0 que contenía 250 μl/ml de albúmina sérica de bovino, 100 μM de ATP con [³P] ATP (0.5 x 10⁶ cpm/ μmola), 10 mM MgCl₂, 100 μM GTPγS y donde se indica 1 μM de agonistas y/o antagonistas para activar los R_{ado} A_{2A} o A_{2B}, 1 μM de H-89 un inhibidor de PKA, 1 μM de un inhibidor de Epac, o 1 μM de AMPc. La reacción catalítica se inició con la adición del kemptido sustrato. Otras indicaciones como en la Fig. 1A. (F). Activación de Rap 1. Los hepatocitos fueron activados con agonistas para los R_{ado} A_{2A} o A_{2B}. Posteriormente, se obtuvieron las membranas (MPH) y se determinó la Rap 1-GTP. Se incluyó un control de hepatocitos sin activar (c) y en todos los casos se determinó la Rap 1 total. Los datos son el promedio ± el error estándar en muestras por duplicado, repetido en 4 experimentos independientes. * p < 0.001, ** p < 0.05

Con estos resultados decidimos usar análogos del AMPc y forskolin para enriquecer nuestra información. Usamos 6 b AMPc que estimula la PKA [12], 8 pc AMPc activador de Epac [13], dibutiril AMPc un activador muy usado y poco específico [14] y forskolin estimula la AC5 independientemente de la participación de un receptor [15]. El forskolin fue el más potente agente para generar AMPc, los análogos fueron inefectivos para generar síntesis de novo de AMPc y no fueron detectados por el método de ensayo usado aquí para medir el AMPc natural (Figura 2A). Los resultados, cuando se usaron los análogos del AMPc en combinación con los agonistas selectivos de los R_{ado} , son los siguientes. El agonista 6 b AMPc impidió la síntesis del AMPc debido a la estimulación del $R_{ado} A_{2A}$ y no modificó la síntesis del AMPc generado por la estimulación del $R_{ado} A_{2B}$ (Fig. 2B). Al contrario, la síntesis del AMPc mediado por la estimulación del $R_{ado} A_{2B}$ se impidió con el análogo del 8 pc AMPc, pero no impidió la síntesis de AMPc mediado por la activación del $R_{ado} A_{2A}$ (Fig. 2B). De manera interesante, el análogo dibutiril AMPc previno la síntesis de AMPc mediado por la activación de los $R_{ado} A_{2A}$ y permitió la síntesis mediada por la activación de los $R_{ado} A_{2B}$ (Fig. 2B). El efecto estimulador del forskolin, elevando la síntesis de AMPc no se modificó con la activación previa de la PKA con 6 b AMPc, pero si se inhibió fuertemente con la activación previa de la Epac con 8 pc AMPc (Fig. 2B), esto es, la activación inicial de Epac fosforila la AC5 de su complejo e impide la acción estimulante directa del forskolin sobre la AC5.

Falta revisar el papel de las fosfodiesterasas (PDE), las enzimas responsables de catabolizar el AMPc y convertirlo en AMP. La corriente actual las responsabiliza de limitar la difusión del AMPc y así establecer mini pozas locales con las que se regulan y limitan las acciones del AMPc [16]. Para estos experimentos se emplearon tiempos más largos de incubación y se usaron 2 inhibidores selectivos de la PDE, el cilostazol para la PDE3B [17] y la olprinona para la PDE3A [18]. La estimulación de las $R_{ado} A_{2A}$ en las MPH mostró un aumento en la poza de AMPc generado cuando se adicionó olprinona, lo que no se observó al añadir cilostazol (Fig. 2C), por lo tanto este complejo multiproteico incluye la PDE3A. A su vez, al estimular las membranas con el $R_{ado} A_{2B}$ la presencia del cilostazol elevó la poza de AMPc sintetizado, y en este caso la olprinona fue inerte (Fig. 2D), por lo que se concluye que este otro complejo multienzimático incluye a la PDE3B.

Al calcular la velocidad de síntesis del AMPc, y la velocidad de su degradación, con base en las pendientes incluidas en las Figs. 2C y 2D se puede decir que la síntesis es 3.6 veces mayor que la degradación en el caso de la respuesta asociada al $R_{ado} A_{2A}$. Para el caso de la respuesta asociada al $R_{ado} A_{2B}$ la síntesis del AMPc es 15 veces más rápida que su degradación.

Disponemos de un dato más de particular relevancia. La totalidad del AMPc medido en cada una de las muestras se encuentra unido a la membrana y no se localiza en el medio que baña la membrana. El experimento realizado fue muy sencillo: al final del período de incubación las muestras fueron centrifugadas y se buscó el AMPc en el sobrenadante y en las membranas. El AMPc del sobrenadante fue menos del 1% del total y el presente en las membranas se extrajo, como en todos los experimentos previos, por acidificación de las mismas. De estos experimentos

concluimos que el AMPc, recién generado y en un sistema de membranas estimuladas con agonistas selectivos para los Rado, no difunde, está fijo al sitio donde se sintetiza, y por él compiten las proteínas efectoras de la señal, la PKA o la Epac y las proteínas responsables del catabolismo del AMPc, las PDEs.

Del total de datos presentados en este trabajo podemos proponer la existencia de dos complejos de proteínas inhibidos en la membrana plasmática de las células hepáticas cuya caracterización funcional es la siguiente. Uno de los complejos responde a la estimulación del Rado A_{2A} y el otro responde a la estimulación del Rado A_{2B} . El complejo integrado al Rado A_{2A} está constituido por el receptor, la proteína G unida al receptor (GPCR) intermediaria entre el receptor y la AC6, encargada de sintetizar al AMPc, que a su vez está ensamblada en la mAKAPs. Estudios de otros autores han demostrado el anclaje de la PKA y PDEs a ésta u otras AKAPs [19]. Por lo que podemos proponer que a la mAKAP se ancla la PKA y la PDE3A, ambas compiten por el AMPc, y tal como mencioné, la velocidad con que la PKA funciona indica que su acción, en tiempos cortos de incubación y a partir de los valores basales de AMPc, es más rápida que la de la PDE3A (Fig. 2C). El complejo proteico integrado al Rado A_{2B} incluye al receptor, la proteína G unida al receptor y puente con la AC5 muy probablemente anclada a una proteína de andamiaje no identificada. En este complejo estaría además la Epac y la PDE3B (Fig. 2D).

A partir de los datos podemos asegurar que el AMPc no difunde de un complejo a otro, que no existen gradientes de concentración del AMPc regulados por la actividad de la PDEs tal como se ha propuesto con anterioridad [14]. En resumen nuestra hipótesis propone que el AMPc generado en una AC anclada a su AKAP mantiene firmemente unido ese AMPc a un sitio al cual tienen acceso por estar unidas a la misma AKAP la proteína efectora –PKA o Epac– y la PDE respectiva. La idea central es que la cinética del AMPc en la señalización no es una cinética del AMPc en solución, sino una del AMPc en estado sólido. Consideramos este cambio como esencial para dar un paso más en el control espacio-temporal del AMPc en el proceso de señalización celular.

Los experimentos presentados aquí, y otros más que decidí no incluir, los realizaron Raquel Guinzberg Perrusquía, Antonio Díaz Cruz, Carlos Acosta Trujillo, María Magdalena Vilchis Landeros, Héctor Vázquez Meza, Nayeli García Hernández y Laura Cristina Badillo Galván, a quienes agradezco su colaboración y su escepticismo.

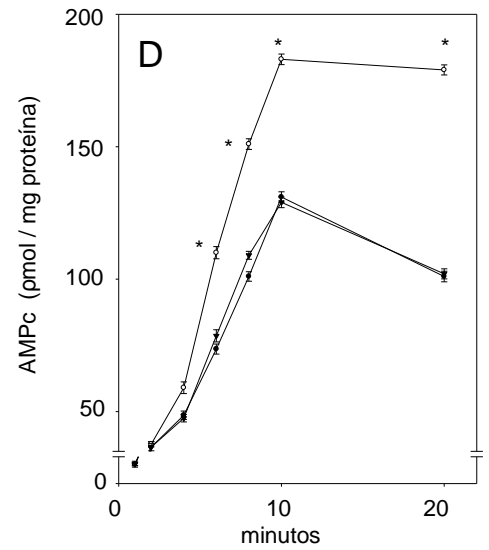
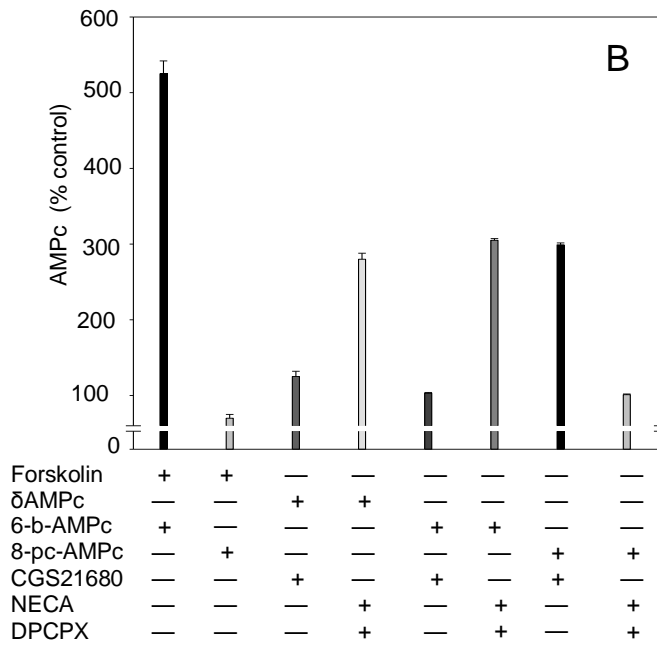
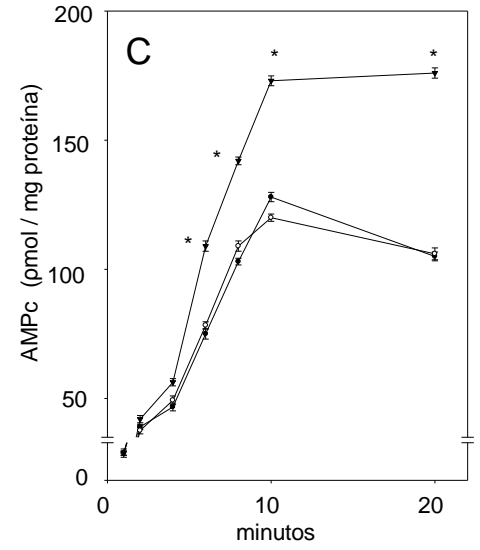
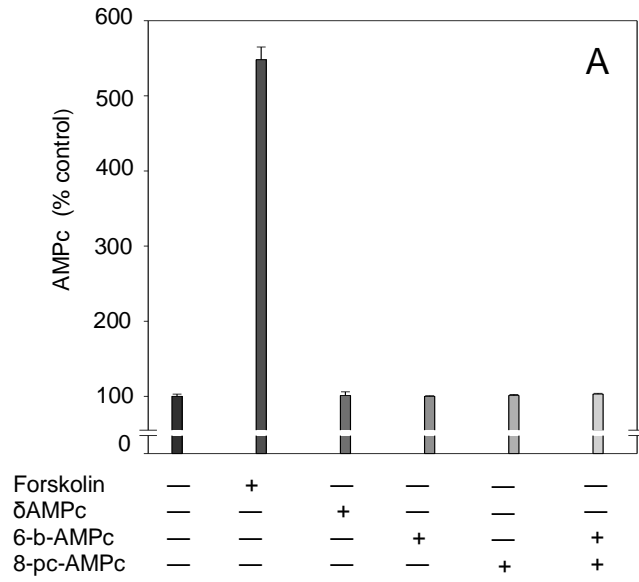


Figura 2 (A). Efecto de análogos del AMPc y del forskolin en la generación de AMPc. Las MPH se incubaron como se describe en la Fig. 1A. Los análogos y el forskolin se usó a una concentración de 1 μ M. Otras indicaciones como en la Fig. 1A. (B). Modulación en la síntesis de AMPc por la acción sucesiva de activadores de la PKA o Epac, seguido por la activación selectiva de los Rado A_{2A} o A_{2B} . Los compuestos se usaron a las concentraciones indicadas en las Figs. 1A y 2A. Otras indicaciones como en la Fig. 1A. (C). Valores de AMPc resultantes de la incubación simultánea de agonistas selectivos para los Rado A_{2A} y de inhibidores selectivos para las PDEs. Las condiciones para generar AMPc son las indicadas en la Fig. 1A, columna 2, excepto que el tiempo de incubación de 2 min se sustituyó por los tiempos indicados en la Fig. Los inhibidores usados fueron 1 μ M cilostazol (\circ), ó 0.1 μ M olprinona (∇). Otras indicaciones como en la Fig. 1A. (D). Valores de AMPc resultantes de la incubación simultánea de agonistas selectivos para los Rado A_{2B} y de inhibidores selectivos para las PDEs. Las condiciones para generar AMPc son las indicadas en la Fig. 1A, columna 3, excepto que el tiempo de incubación de 2 min se sustituyó por los tiempos indicados en la Fig. Se usaron los mismos inhibidores que en la Fig. 2C. Otras indicaciones como en la Fig. 1A. Los datos son el promedio \pm el error estándar en muestras por duplicado, repetido en 4 experimentos independientes. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$

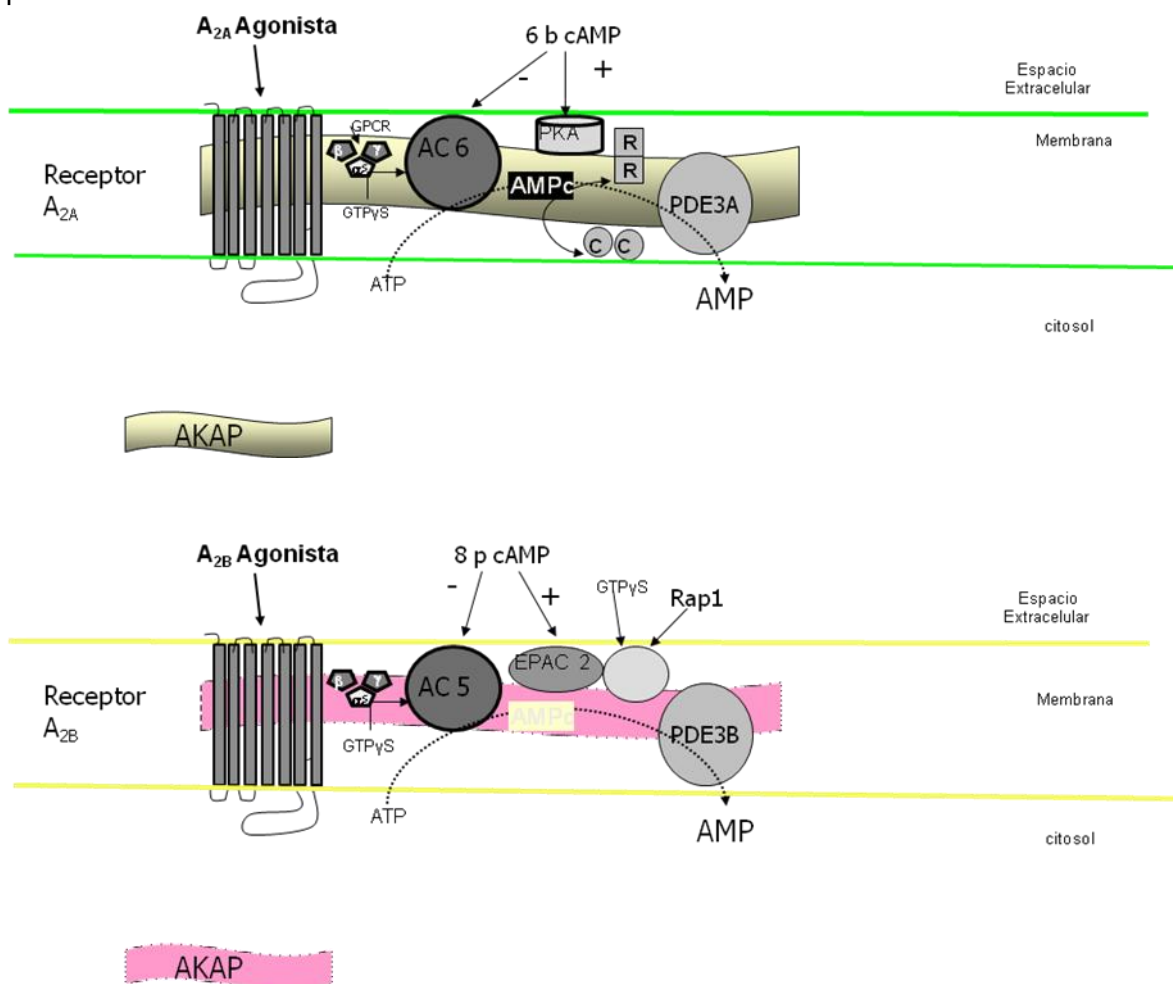


Figura 3. Modelos propuestos para el receptor A_{2A} (A) y para el receptor A_{2B} .

Referencias

1. Wong, W. y Scott, J.D. (2004) *Nature Reviews. Mol Cell Biology* **5**, 959-970
2. Hayes, J.S., Brunton, L.L. y Mayer, S.E. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 5113-5120
3. Zaccolo, M. y Pozzan T. (2002) *Science* **295**, 1711-1715
4. Houslay, M.D. y Adams, D.R. (2003) *Biochem J.* **370**, 1-18
5. Kapiloff, M.S., Piggott, L.A., Sadana, R., Li, J., Heredia, L.A., Henson, E., Efendiev, R. y Dessauer C.W. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 23540-23546
6. González-Benítez, E., Guinzberg, R., Díaz-Cruz, A. y Piña, E. (2002) *Eur J Pharmacol.* **437**, 101-111
7. Guinzberg, R., Uribe, S., Díaz-Cruz, A., Hernández Cruz, A. y Piña E. (2006) *Life Sci.* **79**, 382-390
8. Díaz-Cruz, A., Guinzberg, R., Guerra, R., Vilchis, M., Carrasco, D., García-Vázquez, F.J. y Piña E. (2007) *Free Radic Res.* **41**, 663-672
9. Carr, D W., Stofko-Hahn, R E., Fraser, I.D.C., Cone, R.D. y Scott, J.D. (1992) *J Biol Chem.* **267**, 13376-13382
10. Lochner, A. y Moolman J.A. (2006) *Cardiovascular Drug Reviews* **24**, 261-274
11. Ster, J., de Bock, F., Bertaso, F., Abitbol, K., Daniel, H., Bockaert, J. y Fagni, L. (2009) *J Physiol.* **15**, 101-113
12. Hermsdorf, T. y Dettmer D. (1998) *Cell Signal* **10**, 629-635
13. Enserink, J.M., Christensen, A.E, de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Doskeland, S.O., Blank, J.L. y Bos J.L.(2002) *Nat Cell Biol.* **4**, 901-906
14. Rous, S. (1970) *FEBS Lett* **12**, 45-48
15. Seamon, K.B. y Daly, J.W. (1981) *J Cyclic Nucleotide Res.* **7**, 201-24
16. Baillie, G.S. (2009) *FEBS Journal.* 276: 1790-1799
17. Hanson, M.S., Stephenson, A.H., Bowles, E.A., Sridharan, M., Adderley, S., y Sprague, R.S. (2008) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H786-H793
18. Myou, S., Fujimura, M., Kamio, Y., Ishiur, Y., Tachibana, H., Hirose, T., Hashimoto, T. y Matsuda T. (1999) *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 817-20
19. Dodge, K.L., Khouangsathiene, S., Kapiloff, M.S., Mouton, R., Hill, E.V., Houslay, M.D., Langeberg, L.K. y Scott, J.D. (2001) *EMBO J.* **20** 1921-1930

Semblanza del Dr. Enrique Piña Garza



Nació el 21 de octubre de 1936 en la ciudad de México, Distrito Federal. Es médico cirujano por la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Doctor en Bioquímica en la Facultad de Química de la UNAM.

En la Facultad de Medicina de la UNAM es profesor desde hace más de 54 años.

Ha impartido 64 cursos de licenciatura y posgrado. Se le ha distinguido con los premios "Dr. Eduardo Liceaga" y "Maximiliano Ruiz Castañeda" de la Academia Nacional de Medicina y "Dr. Miguel Otero" del Consejo de Salubridad General de la SSA. Le fue otorgado el Premio Universidad Nacional 1993 de Docencia en Ciencias Naturales por parte de la UNAM, ha recibido diploma, medalla y reconocimiento al Mérito Académico y también el reconocimiento como Profesor Emérito de la Facultad de Medicina, actualmente pertenece al Sistema Nacional de Investigadores con el Nivel III. Ha dirigido 16 tesis de licenciatura, 17 de maestría y 10 de doctorado. Es autor de 5 libros de texto, entre ellos la Bioquímica de Laguna-Piña.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVI, 15 – 26**, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

PAPEL DE LA CARDIOLIPINA EN LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL Y EN EL DAÑO POR REPERFUSION

CARDIOLIPIN ROLE IN THE TRANSITION FROM MITOCHONDRIAL PERMEABILITY AND REPERFUSION INJURY

Edmundo Chávez, Luz Hernández-Esquivel, Natalia Pavón

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, México, D. F.
echavez@salud.gob.mx

Resumen

El aumento en la permeabilidad inespecífica de la membrana interna mitocondrial, fue examinado en mitocondrias de hígado de rata aisladas de ratas hipotiroideas. Se encontró que el estado hipotiroideo provee una protección sustancial contra la apertura de un poro transmembranal inducida por la sobrecarga de Ca^{2+} . Así, estas mitocondrias son menos susceptibles a la transición de la permeabilidad que las ratas eutiroideas. La conclusión anterior se basa en los siguientes dos hechos: i) las mitocondrias hipotiroideas no son estrictamente dependientes de ADP para retener al Ca^{2+} acumulado en la matriz y ii) el carboxiatractilósido, la antimicina A y el carbonilcianuro-m-chlorophenil hidrazona no fueron capaces de promover la salida del Ca^{2+} acumulado. Por otro lado, conociendo que la transición de la permeabilidad

mitocondrial está involucrada en el daño miocárdico por isquemia/reperfusión evaluamos la sensibilidad de los corazones de ratas hipotiroideas al daño por reperfusión, después de un periodo de isquemia de 5 min. Los trazos electrocardiográficos muestran una ausencia absoluta de arritmias, en contraste con lo encontrado en ratas eutiroideas. La liberación al plasma de las enzimas aspartato amino transferasa y creatina cinasa fue menor en las ratas hipotiroideas. Además los estudios histológicos muestran una marcada disminución de edema. Se discute la relevancia del bajo contenido de cardiopina así como la expresión de la adenina nucleótido translocasa como responsables de la resistencia al daño mitocondrial y miocárdico.

Palabras clave: mitocondrias, permeabilidad mitocondrial, isquemia/reperfusión.

Abstract

Membrane permeability transition was examined in liver mitochondria isolated from hypothyroid rats. It was found that such a hypothyroid status provides substantial protection from membrane leakiness as induced by Ca^{2+} overload. Thus, these mitochondria are less prone to undergoing permeability transition than mitochondria from euthyroid rats. The above conclusion was reached on the basis of the following two facts: i) hypothyroid mitochondria are not strictly dependent on the addition of ADP to retain high matrix Ca^{2+} concentrations, and ii) Carboxyatractyloside, antimycin A or carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone failed to promote Ca^{2+} efflux. On the other hand, it is known that mitochondrial permeability transition is involved in the myocardium damage as induced by ischemia/reperfusion. Therefore, the sensitivity of hearts from hypothyroid rats to reperfusion damage, after an ischemic period of 5 min, was evaluated. ECG tracing from hypothyroid rats showed a total absence of post-reperfusion arrhythmias conversely to what was observed in control rats. The release of creatine kinase and aspartate amino transferase to the plasma in hypothyroid rats was found to be lower than that found in euthyroid rats. The histological studies showed a remarkable near absence of edema. The relevance of a low content of cardiopina, as well as the low expression of adenine nucleotide translocase is discussed as responsible for the resistance to the myocardium and mitochondrial membrane damage.

Key words: mitochondria, mitochondrial permeability, ischemia / reperfusion

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias de hígado de ratas hipotiroideas presentan una actividad disminuida de las enzimas de la cadena respiratoria, así como de algunos transportadores membranales [1,2]. Esta baja en la actividad ha sido atribuida a una disminución en la expresión de las respectivas proteínas [3], así como también a una disminución en el contenido de cardiopina en la membrana interna [4]. Estos cambios

en la composición de la membrana le confieren a las mitocondrias propiedades especiales. Por ejemplo Shonfeld et al. [5] demostraron que las mitocondrias de ratas hipotiroideas son menos sensibles al efecto desacoplante del ácido mirístico. Este efecto fue atribuido a una disminución en el contenido de la translocasa de adenín nucleótido [ANT].

Por otro lado, Paradies et al. [6] describieron una actividad disminuida de la citocromo c oxidasa en mitocondrias de ratas hipotiroideas, la cual fue restaurada cuando se añadió cardiolipina. Así mismo, la ANT es una proteína transportadora que para su función es altamente dependiente de cardiolipina. Además, la ANT se ha involucrado en la formación del poro inespecífico transmembranal [7]. Esta función de la translocasa depende de la constitución lipídica de la membrana interna. Considerando lo anterior, los experimentos en este trabajo fueron diseñados con el fin de probar la idea de que en mitocondrias de ratas hipotiroideas, con una disminución en el contenido de cardiolipina y en la expresión de ANT, el Ca^{2+} no induciría la transición de la permeabilidad mitocondrial, ni el daño miocárdico por reperfusión.

MATERIAL Y MÉTODOS.

El hipotiroidismo fue inducido en ratas mediante la remoción quirúrgica de la glándula, como se describió previamente [8]. Después de tres meses de la tiroidectomía se prepararon las mitocondrias de hígado de rata homogeneizando el tejido en 0.25 M de sacarosa-1 mM EDTA, siguiendo el método estándar de centrifugación diferencial. Los movimientos del Ca^{2+} fueron seguidos a 675-678 nm utilizando el Arsenazo III como indicador. En los experimentos con mitocondrias (2 mg de proteína) se utilizó un medio básico consistente en 125 mM de KCl, 10 mM de succinato, 3 mM de fosfato, 10 mM de HEPES, 5 μg de rotenona, 2 μg de oligomicina, y cuando se indica 100 μM de ADP, 50 μM de CaCl_2 , 50 μM de Arsenazo III y 10 μM de safranina. El potencial transmembranal fue seguido a 511-533 nm utilizando safranina. La isquemia y reperfusión fue establecida de acuerdo a Bobadilla et al. [9]. Los estudios histológicos se efectuaron como se establece en [9].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados de la Fig. 1A indican que la inhibición de la salida del Ca^{2+} , en mitocondrias aisladas de ratas eutorioideas, depende estrictamente de la presencia de altas concentraciones de ADP. Se puede observar que en ausencia de ADP existe una rápida liberación del catión acumulado. No obstante después de la adición del nucleótido, la salida del Ca^{2+} fue inhibida de manera proporcional a las concentraciones crecientes de ADP; la máxima inhibición se alcanzó con 150 μM de ADP. Lo anterior implica que la inhibición de la salida del Ca^{2+} depende de la fijación de ANT en el lado interno de la membrana interna mitocondrial por el ADP, lo que resulta en el cierre del poro inespecífico [10]. Un cuadro diferente se observa en mitocondrias aislada de ratas hipotiroideas (Fig. 1B). En estas mitocondrias, no obstante la ausencia de ADP el poro inespecífico permanece cerrado; por lo tanto la salida del cation bivalente se encuentra inhibida. Sin embargo, debe hacerse notar que para alcanzar una completa inhibición se requiere de la adición de 30 μM de ADP.

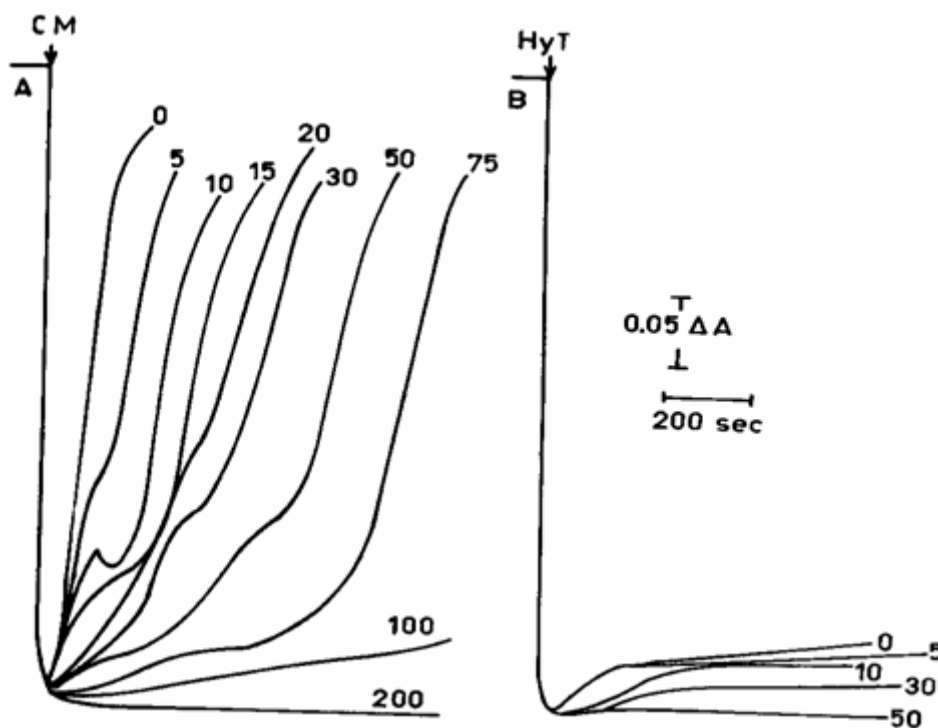


FIGURA 1. Inhibición de la salida del calcio en ausencia de ADP en mitocondrias de ratas hipotiroideas.

En contraste con el efecto protector del ADP sobre el aumento en la permeabilidad, las mitocondrias se transforman en hiperpermeables después de la adición de carboxiatractilósido (CAT). La apertura del poro se debe a la estabilización de ANT del lado citosólico de la membrana interna [10]. La Fig. 2A muestra que en mitocondrias de ratas eutiroideas la adición de 0.016 μM de carboxiatractilósido, inicia una descarga rápida del Ca^{2+} acumulado en la matriz. De manera interesante la Fig. 2B demuestra que las mitocondrias de ratas hipotiroideas son insensibles a la adición de CAT.

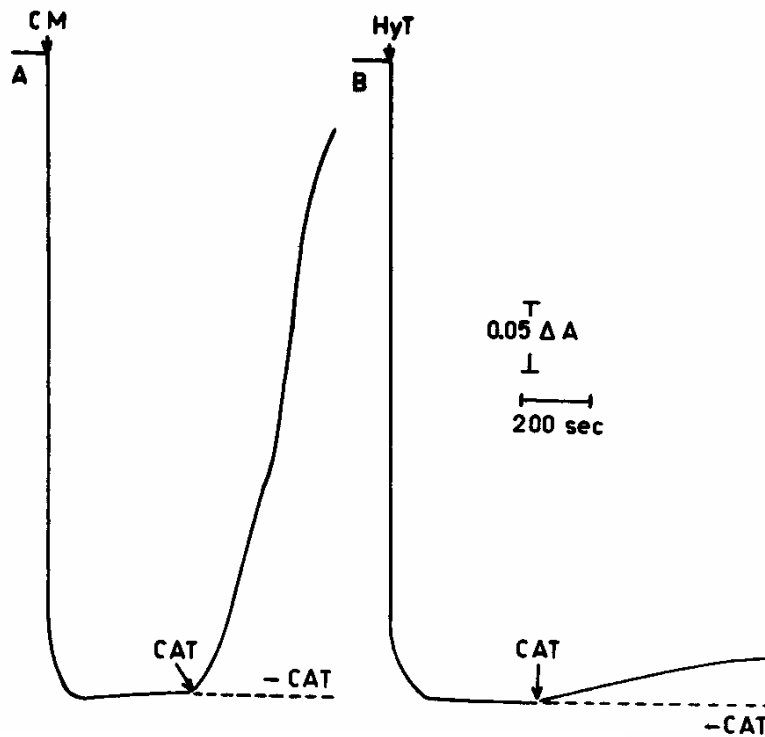


Figura 2. Imposibilidad del carboxiatractilósido (CAT) para inducir la salida de calcio en mitocondrias hipotiroideas.

Con el objetivo de establecer aún más la resistencia de las mitocondrias hipotiroideas al cambio de la permeabilidad de específica a inespecífica, otros inductores de la transición fueron estudiados. Estudios previos [10,11] han demostrado que la antimicina A y el CCCP inducen la apertura del poro. De acuerdo con lo anterior, la Fig. 3A revela que en mitocondrias control la adición de 0.2 μM de CCCP o 0.43 μM de antimicina A son suficientes para inducir la descarga del Ca^{2+} . De manera notable,

cuando las acciones del CCCP y la antimicina A fueron evaluadas en mitocondrias hipotiroideas estos reactivos no fueron capaces de aumentar la permeabilidad.

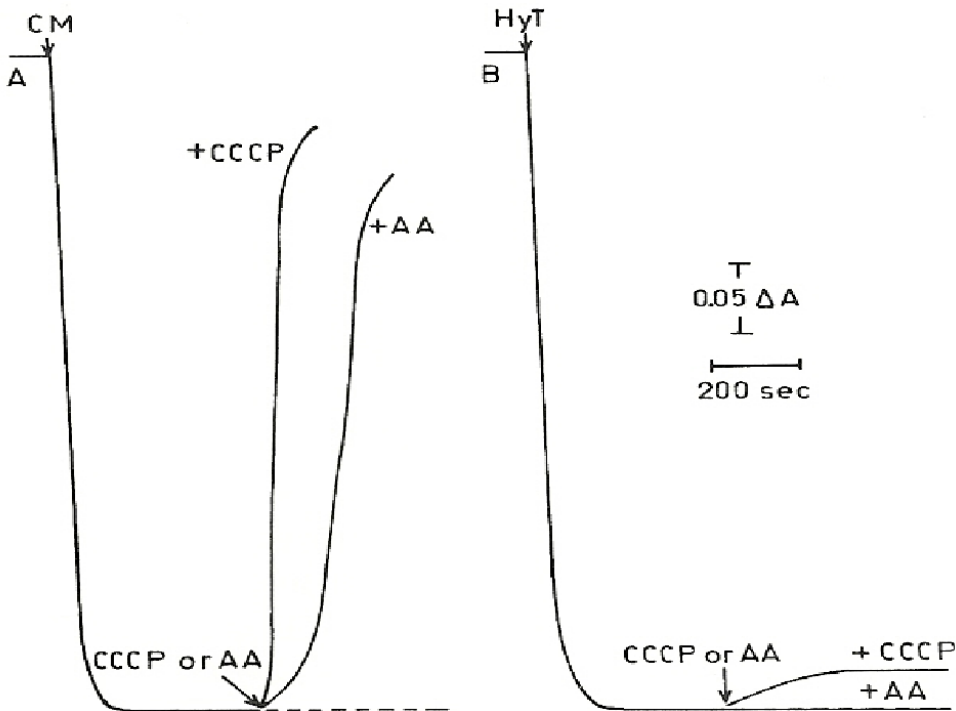


Figura 3. Imposibilidad de la antimicina A (AA) y el desacoplante CCCP para inducir la salida de calcio en mitocondrias hipotiroideas.

Se sabe que la transición de la permeabilidad es iniciada por despolarización de la membrana mitocondrial. Lo anterior es cierto para mitocondrias de ratas eutiroideas; como se muestra en la Fig. 4, la adición de $0.2 \mu\text{M}$ de CCCP a estas mitocondrias (CM) produce un colapso total del gradiente eléctrico transmembranal; sin embargo el CCCP colapsa en menor grado el $\Delta\psi$ en mitocondrias hipotiroideas (HyT).

TABLA 1 Contenido de cardiolipina en mitocondrias de ratas controles e hipotiroideas

<u>Condición</u>	nmol cardiolipina mg proteína ⁻¹
<u>Eutiroideas</u>	<u>29.8 ± 1.3</u>
<u>Hipotiroideas</u>	<u>18.7 ± 1.8</u>

La pregunta que surge es: ¿realmente existe una disminución en el contenido de cardiolipina? El experimento mostrado en la Tabla 1 señala que en mitocondrias de ratas hipotiroideas existe una clara disminución en el contenido de este fosfolípido.

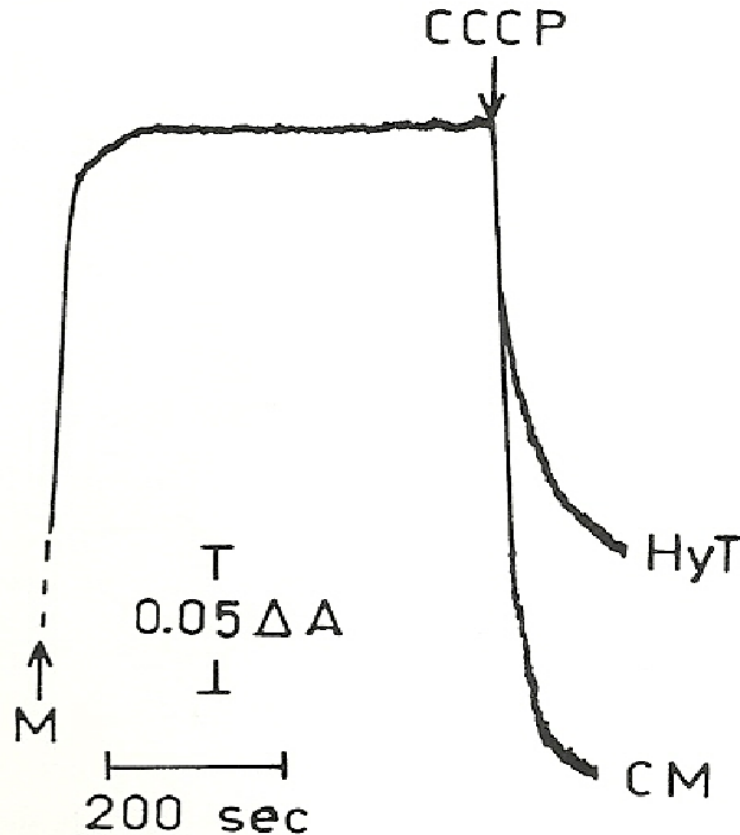


Figura 4. Colapso del gradiente eléctrico transmembranal por la adición del desacoplante CCCP a mitocondrias de ratas hipotiroideas.

Los resultados anteriores demuestran que el hipotiroidismo convierte a las mitocondrias resistentes a la transición de la permeabilidad. Considerando que el daño mitocondrial subyace en el daño miocárdico por isquemia/reperfusión, decidimos explorar la posibilidad de que las ratas hipotiroideas fueran insensibles a las arritmias promovidas por la reperfusión. Los resultados de la Fig. 5., panel A, muestran la taquicardia y las arritmias presentadas en ratas control durante el periodo de reperfusión. La parte inferior del panel muestra la tensión arterial; como se observa la TA casi desaparece en el periodo de reperfusión. Esto se debe a que los latidos cardiacos no son efectivos. El panel B muestra un cuadro más dramático en cuanto a la taquicardia y las arritmias, este panel señala la respuesta del hipertiroidismo al estrés

oxidativo durante la reperfusión. En el panel C se observa que el corazón se encuentra en ritmo sinusal, pese a la reperfusión ya que el experimento se llevó a cabo con ratas hipotiroideas.

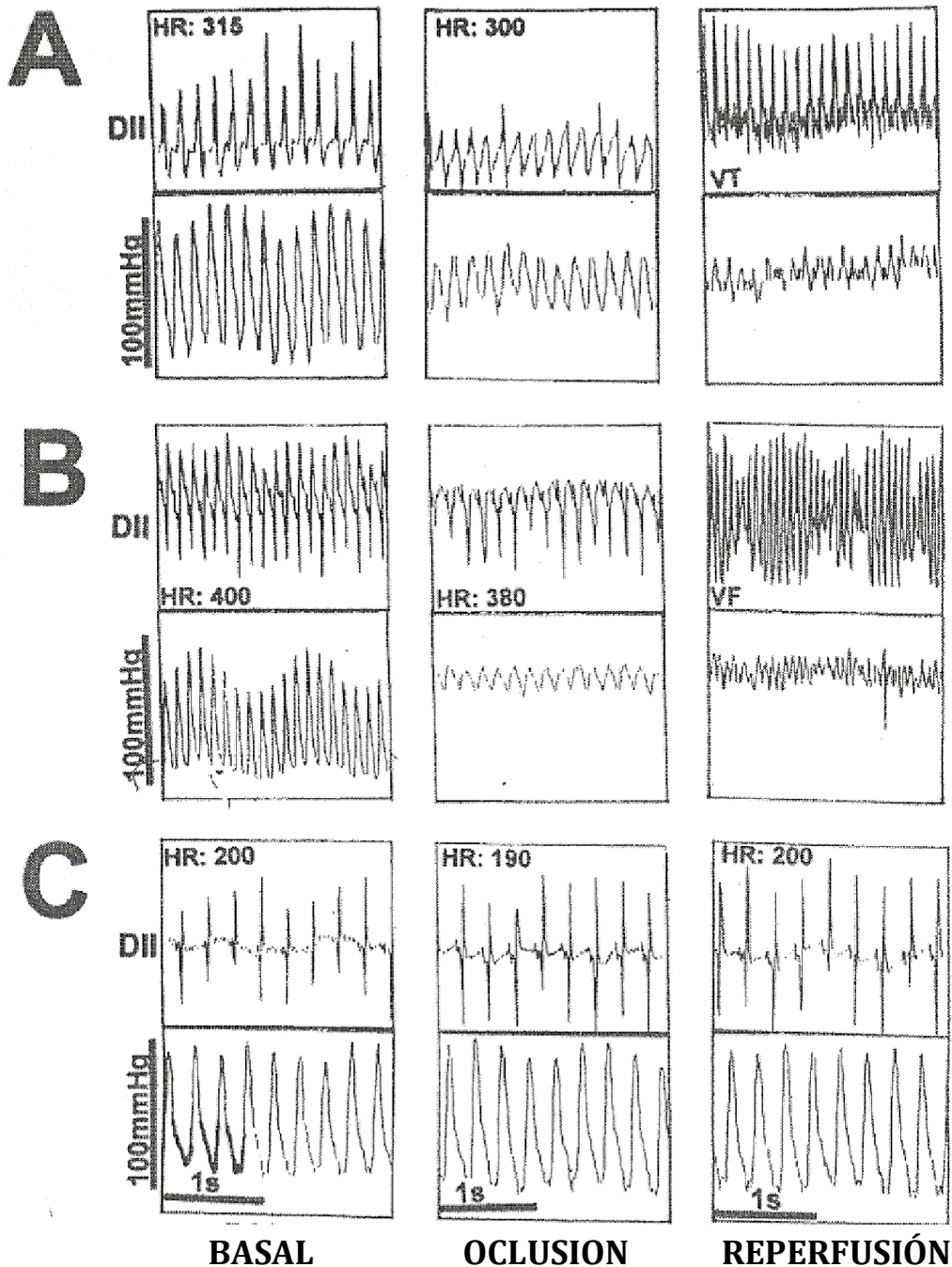


Figura 5. Trazos electrocardiográficos y de presión sanguínea de corazones de ratas Control (A); de ratas hipertiroideas (B); y de ratas hipotiroideas (C)

El experimento en la Tabla 2 muestra las concentraciones, en plasma, de las enzimas creatina cinasa y aspartato amino transferasa. Las actividades se determinaron después del periodo de reperfusión.

TABLA 2 Concentración plasmática de enzimas marcadoras de daño miocárdico

<u>Enzima</u>	<u>Eutiroideas</u>	<u>Hipertiroideas</u>	<u>Hipotiroideas</u>
CK (UI/L)	338.98 ± 122.75	325.71 ± 144.84	68.2 ± 49.22
<u>ASAT (UI/L)</u>	<u>15.30 ± 8.40</u>	<u>29.30 ± 11.03</u>	<u>14 ± 3.08</u>

La fig. 6 muestra las micrografías de tejido miocárdico. En el panel A se muestra la imagen del tejido normal, como se observa hay ausencia de edema y de bandas de contracción. En contraste, en el panel B la imagen de un miocardio reperfundido muestra desarrollo de edema así como también el desarrollo de bandas de contracción. Sin embargo, como se observa en el panel C las fibras miocárdicas preservan su aspecto estriado y aunque existe edema este se ve en menor proporción que en el miocardio de ratas control.

Este trabajo contribuye al conocimiento de que el estado tiroideo influencia la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, i.e., las mitocondrias de ratas hipertiroideas tienen una creciente permeabilidad inespecífica a protones [12], así como a iones y metabolitos, en ausencia de inductores como el carboxiatractilósido [13]. En contraste el hipotiroidismo convierte a la membrana interna mitocondrial en impermeable a iones y metabolitos. El marcado contraste en las propiedades de permeabilidad radica en la diferente composición de la fase lipídica de la bicapa. En este trabajo se demuestra que las mitocondrias de ratas hipotiroideas la transición de la permeabilidad, inducida por Ca^{2+} , CAT y CCCP no se llevó a cabo. Nuestra propuesta es que las mitocondrias hipotiroideas son resistentes a la transición de la permeabilidad debido a la incapacidad de la translocasa de adenín nucleótidos para transformarse en un poro inespecífico. Para que esto ocurra se requiere que la ANT cambie su conformación del lado de la matriz hacia el lado citosólico. Para que esta movilidad se favorezca es importante la fluidez de la bicapa y considerando la disminución en la cantidad de cardiolipina dicha fluidez se ve comprometida. Aunque la diferente constitución de la membrana interna parece ser la responsable de la resistencia a la

permeabilidad creciente, se debe de tomar en cuenta, también, que en el hipotiroidismo hay una menor expresión de ANT [5]. Ciertamente el contenido de ANT disminuye de 58 pmol/mg en eutiroides a 40 pmol/mg en hipotiroideas.

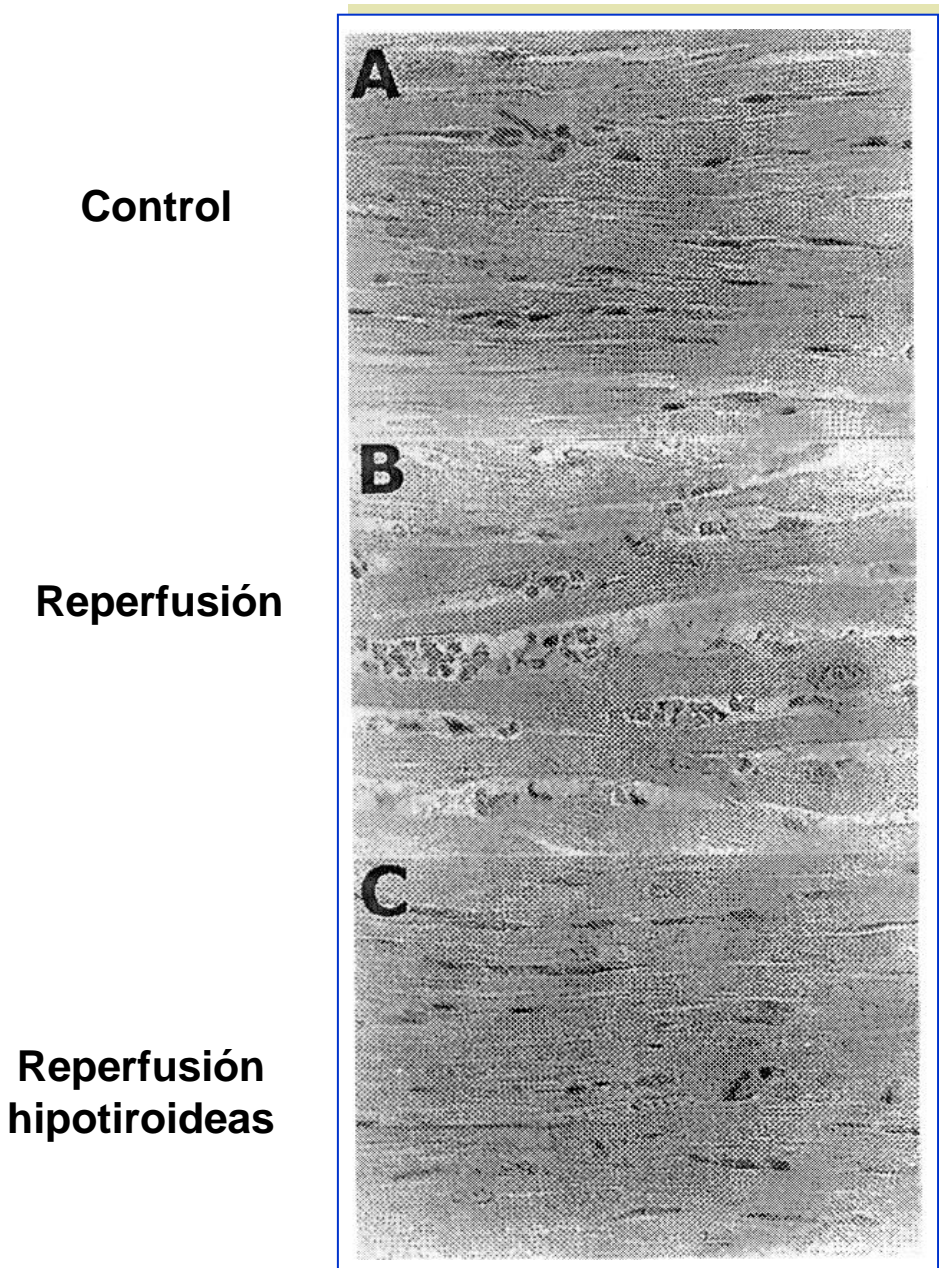


Figura 6. Imágenes histológicas de tejido miocárdico. En A se muestra la imagen de corazones no tratados. En B se presenta la imagen de corazones de ratas control sometidos a periodos de isquemia (5 min) y reperusión (5 min). En C se muestra la imagen de tejido de ratas hipotiroideas sometidos a periodos de isquemia y reperusión, 5 min cada uno

El aumento en la permeabilidad inespecífica mitocondrial es el responsable del daño miocárdico por reperfusión. Por lo tanto no es extraño que en ratas hipotiroideas exista una protección contra el estrés oxidativo, como se demuestra en este trabajo. Es claro que la ausencia de anomalías electrocardiográficas como las arritmias y la disminución en la liberación de enzimas marcadoras hacia el plasma, abren la posibilidad de que los pacientes hipotiroideos, evaluados para ser reperfundidos sean menos susceptibles al daño miocárdico por radicales libres derivados del oxígeno.

REFERENCIAS.

1. Paradies, G. and Ruggiero, F. M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1070**: 180-186.
2. Paradies G., Rugiero, F. M., Dinos, P., Petrosillo, G. and Quagliariello, E. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **307**: 91-95.
3. Horrum, M. A., Tobin, R. B. and Ecklund, R. E. (1985) *FEBS Lett Mol Cell Endocrinol.* **41**, 163-169.
4. Pehowich, D.J. (1995) *Biochim Biophys Acta.* **1235**: 231-238
5. Schonfeld, P., Wieckowski, M.R.Wojtczak, L. (1992) *FEBS Lett.* **416**: 19-22.
6. Paradies, G., Petrosillo, G., Rugiero, F.M. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1319**: 5-8
7. Asimakis, G.K., Sordhal, L.A. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **179**: 300-310.
8. Chávez, E., Franco, M., Reyes-Vivas, H., Zazueta, C., Ramírez, J., Carrillo, R.(1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1407**: 243-248.
9. Bobadilla, I., Franco, M.m Cruz, D., Zamora, J., Robles, S.G., Chávez, E. (2001) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**: 499-506.
10. Chávez, E., Jay, D. (1987) *J. Bioenerg. Biomembr.* **19**: 571-580.
11. Chávez, E., Meléndez, E., Zazueta, C., Reyes-Vivas, H., Perales, S.G. (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**: 961-968.
12. Brand, M.D., Steverding, D., Kadenbach, S., Stevenson, P., Hafner, R.P. (1992) *Eur. J. Biochem.* **206**: 775-781.
13. Shears, S.B., Bronk, J.R. (1981) *FEBS Lett.* **126**: 9-12.

Semblanza del Dr. Edmundo Chávez Cosío



Es Médico Cirujano, egresado de la Facultad de Medicina, UNAM (1965). Es Profesor de Asignatura desde 1964. a la fecha, en el Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina UNAM. Es Investigador Titular F del Departamento de Bioquímica, del Instituto Nacional de Cardiología, “Ignacio Chávez” e Investigador Nacional Nivel III, desde 1990

Tiene 106 artículos publicados en revistas internacionales indizadas, 10 de ellos en los últimos tres años; además de 16 artículos publicados en revistas no indizadas y a sido citado 750, sin autocitas.

Ha dirigido 7 tesis de licenciatura, 8 de Maestría en Ciencias y 4 doctorales Societades a las que pertenece:

Sociedad Mexicana de Bioquímica

Academia Mexicana de Ciencias

Academia Nacional de Medicina.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVI, 27 – 38, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

EL TRANSPORTE Na^+ -DEPENDIENTE DE LA TAURINA SE REALIZA SOLAMENTE EN LA MEMBRANA ABLUMINAL DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Na^+ -DEPENDENT TRANSPORT OF TAURINE IS FOUND ONLY ON THE ABLUMINAL MEMBRANE OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER

Hector Rasgado-Flores, Ashwini Mokashi y Richard A. Hawkins

Departamento de Fisiología y Biofísica. The Chicago Medical School
Rosalind Franklin University of Medicine and Science
3333 Green Bay Road, North Chicago, IL 60064-3095. USA
Hector.Rasgado@rosalindfranklin.edu

RESUMEN

Se aislaron membranas plasmáticas luminal y abluminal de microvasos sanguíneos del cerebro de bovino y se utilizaron para identificar y caracterizar el transporte dependiente de Na^+ y facilitado por taurina. El potencial transmembrana, calculado de las constantes aparentes de afinidad de los transportadores de taurina, se determinó sobre un rango de concentraciones de taurina desde $0.24 \mu\text{M}$ a $11.4 \mu\text{M}$. Las membranas abluminales tuvieron tanto transporte Na^+ -dependiente como facilitado de la taurina, mientras que las membranas lumbinales sólo tuvieron transporte facilitado. La aparente K_m para el transporte facilitado y Na^+ -dependiente de la taurina fue de $0.06 \pm 0.02 \mu\text{M}$ y $0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$, respectivamente. El transporte Na^+ -dependiente de taurina fue

dependiente del voltaje en el rango estudiado de voltajes (-25 a -101 mV). El transporte fue más de 5-veces mayor a -101 mV que a -25 mV. La sensibilidad se estudió en un rango de osmolaridades (229 a 398 mOsm/kgH₂O) utilizando manitol como el agente osmótico para ajustar la osmolaridad. Para estos experimentos, la concentración de Na⁺ se mantuvo constante a 50 mM, y el potencial transmembrana calculado fue de -59 mV. El sistema de transporte Na⁺-dependiente fue sensible a la osmolaridad, con la tasa más alta a 229 mOsm/kg H₂O.

Palabras clave: aminoácido, transporte activo, capilares cerebrales, células endoteliales, voltaje-dependiente, polaridad.

Abstract

Luminal and abluminal plasma membranes were isolated from bovine brain microvessels and used to identify and characterize Na⁺-dependent and facilitative taurine transport. The calculated transmembrane potential was -59 mV at time 0, external Na⁺ (or choline under putative zero-trans conditions) was 126 mM (T= 25°C). The apparent affinity constants of the taurine transporters were determined over a range of taurine concentrations from 0.24 μM to 11.4 μM. Abluminal membranes had both Na⁺-dependent taurine transport as well as facilitative transport while luminal membranes only had facilitative transport. The apparent K_m for facilitative and Na⁺-dependent taurine transport were 0.06 ± 0.02 μM and 0.7 ± 0.1 μM, respectively. The Na⁺-dependent transport of taurine was voltage dependent over the range of voltages studied (-25 to -101 mV). The transport was over 5 times greater at -101 mV compared to when V_m was -25 mV. The sensitivity to external osmolality of Na⁺-dependent transport was studied over a range of osmolalities (229 to 398 mOsm/kgH₂O) using mannitol as the osmotic agent to adjust the osmolality. For these experiments the concentration of Na⁺ was maintained constant at 50 mM, and the calculated transmembrane potential was -59 mV. The Na⁺-dependent transport system was sensitive to osmolality with the greatest rate observed at 229 mOsm/kg H₂O.

Key words: amino acid, active transport, brain capillaries, endothelial cells, voltage dependent, polarity

INTRODUCCIÓN

La tumefacción del cerebro puede producirse por una gran variedad de condiciones, tales como: hiperexcitabilidad, hipoglicemia, estado epiléptico, isquemia, anoxia, trauma de la cabeza, hiponatremia y encefalopatía hepática [17]. En respuesta a tales alteraciones osmóticas, se alteran las concentraciones de los aminoácidos, particularmente de la taurina [11]. Por ejemplo, en condiciones hipo-osmolares, los astrocitos y las neuronas liberan taurina al líquido extracelular [4, 13, 18, 22] en un esfuerzo por aumentar la osmolaridad externa.

La taurina (ácido amino sulfónico) es un zwitterión con grupos cargados tanto positiva y negativamente y un punto isoeléctrico de 5.16 [11]; por ello, está casi

completamente cargado negativamente a un pH de 7.4. Debido a que es un zwitterión, la taurina es hidrofílica y no puede cruzar las membranas celulares sin la asistencia de vías de transporte. La mayor vía metabólica para la síntesis de taurina ocurre en el hígado por la vía de la cisteína ácido sulfínico. La taurina parece ser sintetizada principalmente en el hígado [15], entrando y saliendo del cerebro por medio de transportadores [12, 26, 28]. La taurina no es tóxica y su principal función parece estar involucrada en mantener el balance osmótico.

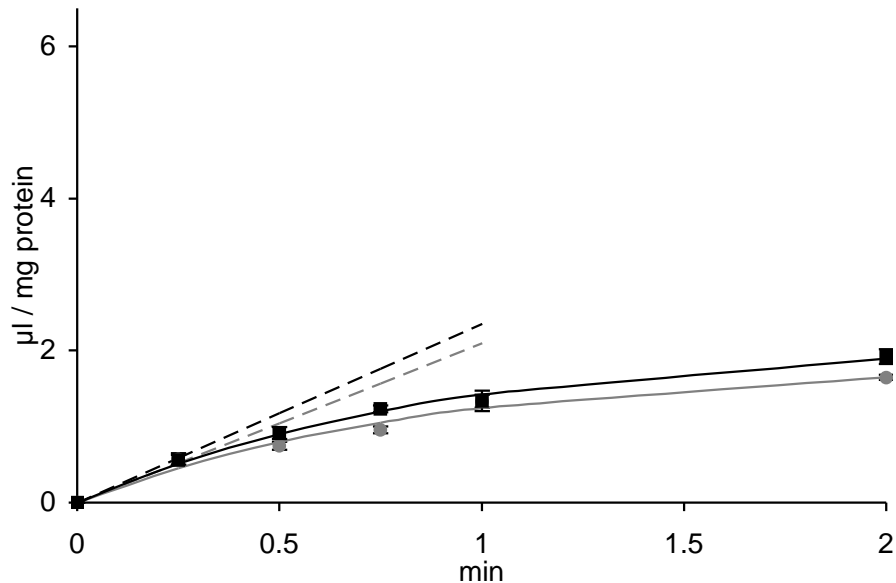


Figura 1: Transporte de taurina en membranas luminales. Se incubó [³H]-taurina (0.487 μM) con microvesículas luminales durante los tiempos indicados. En cada prueba se usó un gradiente de entrada de Na⁺ (cuadrados negros, 126 mM de Na⁺ inicial externo, 0 mM de Na⁺ interno). Se sustituyó el Na⁺ con colina⁺ (círculos grises) para determinar el transporte facilitado. Se usó un gradiente de K⁺ dirigido hacia afuera (140 mM de K⁺ interno, y 14 mM de K⁺ externo) en todas las pruebas. El potencial transmembrana calculado fue de -59 mV a 25°C [9]. Todos los valores son promedios de 8 determinaciones ± SE. Las líneas interrumpidas indican las velocidades iniciales. La velocidad inicial en presencia de Na⁺ fue de 2.3 ± 0.2 μl × mg proteína⁻¹ × min⁻¹ y de 2.1 ± 0.4 (SE) μl × mg proteína⁻¹ × min⁻¹ en presencia de colina⁺. La diferencia entre las velocidades no fue significativa.

El cerebro de los vertebrados está casi completamente cubierto por membranas celulares, conocidas colectivamente como la barrera hemato-encefálica (BHE), a través de la cual deben pasar los metabolitos para entrar o salir del cerebro. Redes extensas de uniones apretadas separan las membranas de las células capilares endoteliales del cerebro en la cara luminal (la cara celular que da a la sangre) y la abluminal (la cara celular que da al cerebro): por consiguiente, están polarizadas [7]. Por consiguiente, tienen que atravesarse dos membranas para entrar o salir del líquido intersticial del cerebro (LIC).

Los nutrientes hidrófilico, tales como la taurina y otros aminoácidos, requieren la presencia de acarreadores tanto en la membrana luminal como en la abluminal para poder cruzar la BHE. Nosotros desarrollamos técnicas para separar las membranas luminal y abluminal, lo cual nos permite estudiar cada lado de la BHE independientemente de la otra [7, 8]. El propósito de este estudio fue caracterizar los sistemas de transporte de la taurina en cada membrana.

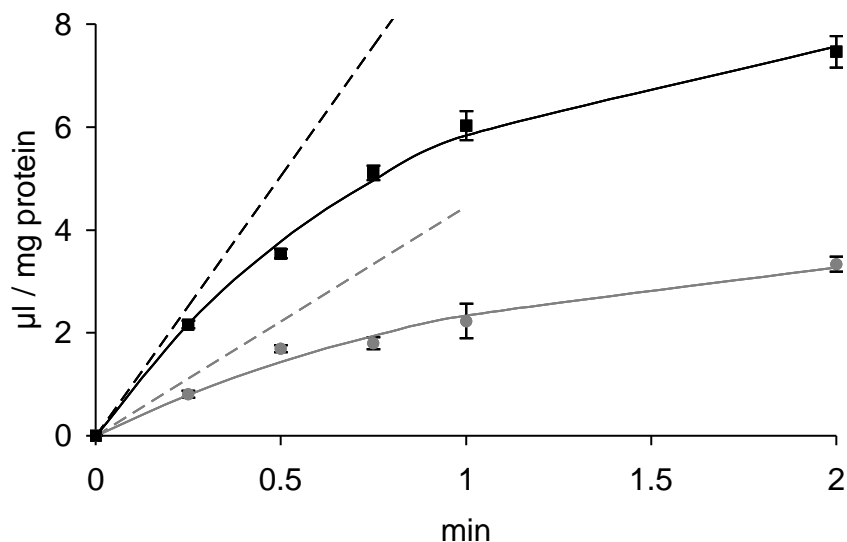


Figure 2: Transporte Na⁺-dependiente y facilitado de la taurina en membranas abluminales. Se incubó [³H]-taurina (0.487μM) con microvesículas enriquecidas con membrana abluminal durante los tiempos indicados. Se utilizó un gradiente de entrada de Na⁺ (cuadrados negros, 126 mM de Na⁺ inicial externo, 0 mM de Na⁺ interno) para cada prueba. Se sustituyó el Na⁺ con colina⁺ (círculos grises) para determinar el transporte facilitado. Se usó un gradiente de K⁺ dirigido hacia afuera (140 mM de K⁺ interno, y 14 mM de K⁺ externo) en todas las pruebas. El potencial transmembrana calculado fue de -59 mV a 25°C [9]. Todos los valores son promedios de 8 determinaciones ± SE. Las líneas interrumpidas indican las velocidades iniciales. La velocidad inicial en presencia de Na⁺ fue de 10.1 ± 0.9 (SE) μl × mg proteína⁻¹ × min⁻¹ y de 3.6 ± 0.8 (SE) μl × mg proteína⁻¹ × min⁻¹ en presencia de colina⁺. La diferencia entre las velocidades fue significativa.

Entrada de taurina a las membranas lumbinales.

La entrada de taurina a las membranas luminal y abluminal se estudió a lo largo del tiempo en la presencia de gradientes ya sea de Na⁺ o colina⁺ para determinar qué tipo de transporte podía ser detectado ya sea Na⁺-dependiente o facilitado. (El potencial transmembrana calculado fue de -59 mV a 25°C). Las tasas máximas de transporte facilitativo y Na⁺-dependiente fueron 2.3 ± 0.2 (SE) μl × mg proteína⁻¹ × min⁻¹ y 2.1 ± 0.4 (SE) μl × mg proteína⁻¹ × min⁻¹, respectivamente (Figura 1). La diferencia no fue significativa. De tal manera, que si el transporte Na⁺-dependiente estaba presente, representaba tan sólo un componente menor, el transporte facilitado fue la actividad predominante en la membrana luminal.

Entrada de taurina a las membranas abluminales.

En las membranas abluminales había evidencia de ambos tipos de transportes, Na⁺-dependiente y facilitado, con tasas máximas de 10.1 ± 0.9 (SE) $\mu\text{l} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ y 3.6 ± 0.8 (SE) $\mu\text{l} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, respectivamente (Figura 2). Por lo tanto, el transportador predominante parece ser el Na⁺-dependiente, pero también estaba presente la actividad del transporte facilitado (Figura 4).

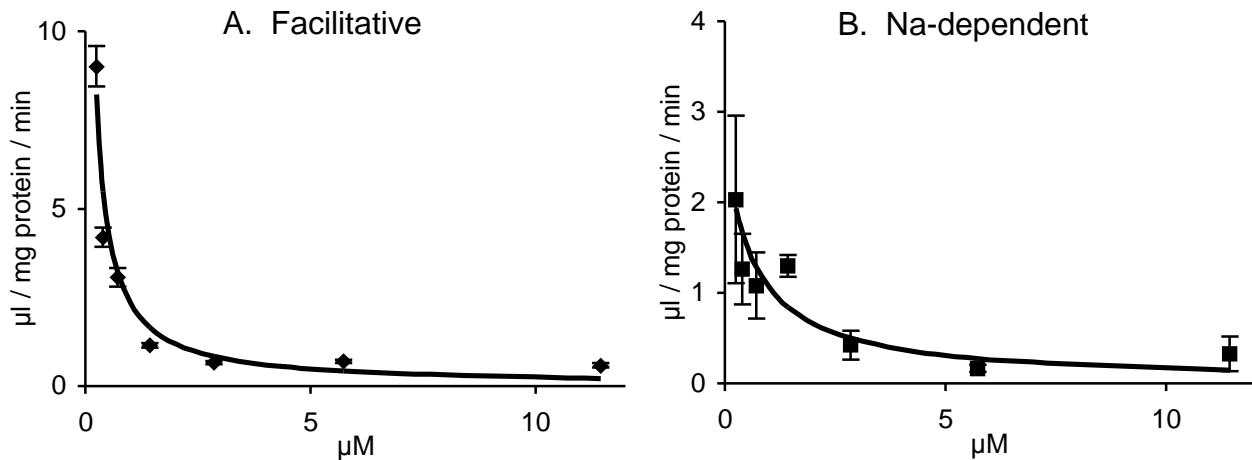


Figura 3: Dependencia de la concentración de taurina en el transporte en membranas abluminales. Se incubó un rango de concentraciones de [³H] taurina (0.24 a 11.4 μM) con microvesículas abluminales durante 15 seg para medir la tasa inicial de transporte. Todos los resultados se expresaron como liberación ($\mu\text{l} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). El análisis no lineal de cuadrados mínimos proporcionó valores K_m de 0.06 ± 0.02 μM para el transporte facilitado y de 0.7 ± 0.1 μM para el transporte Na⁺-dependiente. La diferencia entre los valores K_m fue significativa.

Constantes de afinidad aparente.

Las constantes de afinidad aparente de los transportadores Na⁺-dependiente y facilitado se determinaron sobre un rango de concentraciones de taurina de 0.24 μM a 11.4 μM utilizando el protocolo de liberación de taurina [21]. La K_m aparente para el transporte facilitado fue de 0.06 ± 0.02 μM ; la K_m aparente para el transporte Na⁺-dependiente fue significativamente mayor, 0.7 ± 0.1 μM (Figura 3).

Osmolaridad y transporte Na⁺-dependiente.

La influencia de la osmolaridad sobre el transporte Na⁺-dependiente se midió sobre un rango de osmolaridades de 229 hasta 398 mOsm/kg H₂O. El transporte de taurina fue significativamente mayor a 229 mOsm/ kg H₂O que con las otras osmolaridades examinadas (Figura 5). Por consiguiente, el transporte Na⁺-dependiente de taurina parece ser estimulado por condiciones hipotónicas bajo concentraciones constantes de Na⁺ y taurina y V_m.

Dependencia del voltaje del transporte.

La dependencia del voltaje se determinó sobre un rango de potenciales transmembrana calculados (de -28.2 mV a -101 mV). Los resultados indicaron que el transporte de

taurina dependiente del Na^+ era sensible al voltaje, siendo estimulado significativamente por la hiperpolarización. Sin embargo, fue difícil determinar el número real de cargas transportadas, ya que no fue posible experimentalmente exceder -101 mV utilizando la preparación de vesículas (Figura 6).

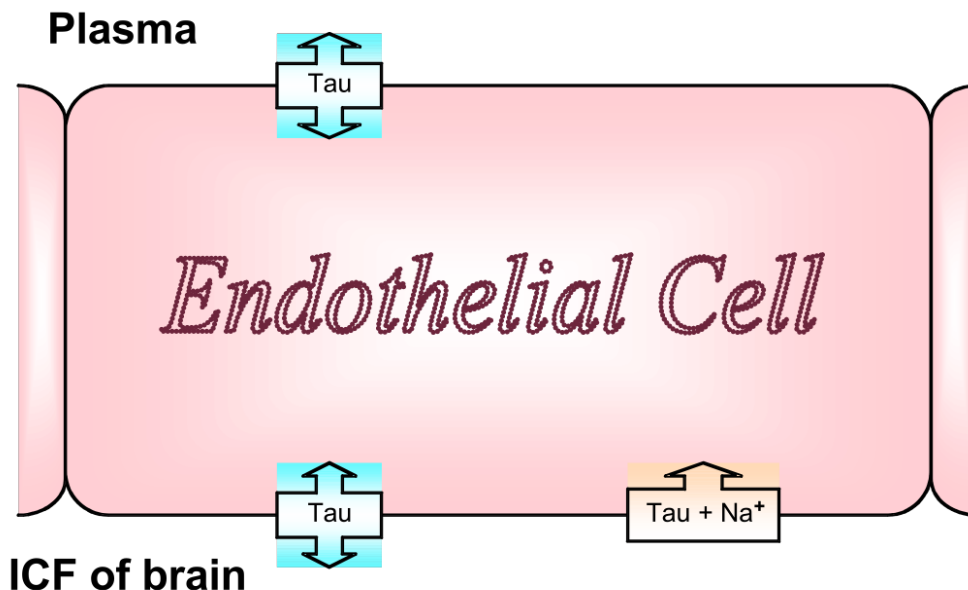


Figura 4. Transporte de taurina a través de la barrera hematoencefálica. Se encontraron transportadores facilitativos en ambas membranas que presumiblemente transportan taurina en ambas direcciones. El transportador Na^+ -dependiente se encontró solamente en la membrana luminal en posición tal para dirigir la taurina del líquido intersticial cerebral hacia las células endoteliales del BHE, desde donde la taurina se puede difundir hacia la circulación.

DISCUSIÓN

Pasantes-Morales et al. [15] estudiaron la formación de taurina en vivo y concluyeron que la taurina probablemente no era sintetizada en el cerebro sino que se formaba en el hígado y era transportada al cerebro. Nosotros encontramos transporte facilitado tanto en las membranas luminal (Figure 1) como en la abuminal (Figure 2) de la BHE con actividades transportadoras similares, 2.1 ± 0.4 y $3.6 \pm 0.8 \mu\text{l} \times \text{mg proteína}^{-1}$, respectivamente. La concentración media de saturación (K_m) en la membrana abuminal fue de $0.06 \pm 0.02 \mu\text{M}$ (Figura 3). Por lo tanto, existe el transporte facilitado que permite la entrada favorable de taurina al cerebro desde la circulación.

La presencia de vías de difusión facilitada para la taurina tanto en las membranas luminal y abuminal de la BHE indican que esta molécula es transportada bidireccionalmente a través de la BHE, impulsada por la diferencia en la concentración de esta molécula entre el plasma y el líquido intersticial del cerebro. Es interesante el hecho de que el transportador de taurina dependiente del Na^+ parece estar presente

sólo en la membrana abluminal, lo cual indica que la taurina puede ser movilizada del cerebro aun en ausencia de un gradiente de concentración favorable para la taurina a través de la membrana abluminal. El hecho de que la afinidad aparente para el transporte facilitado de la taurina es 10 veces mayor que para el transporte Na^+ -dependiente sugiere que este último mecanismo se activa solamente cuando el primero está saturado y trabajando a su capacidad total.

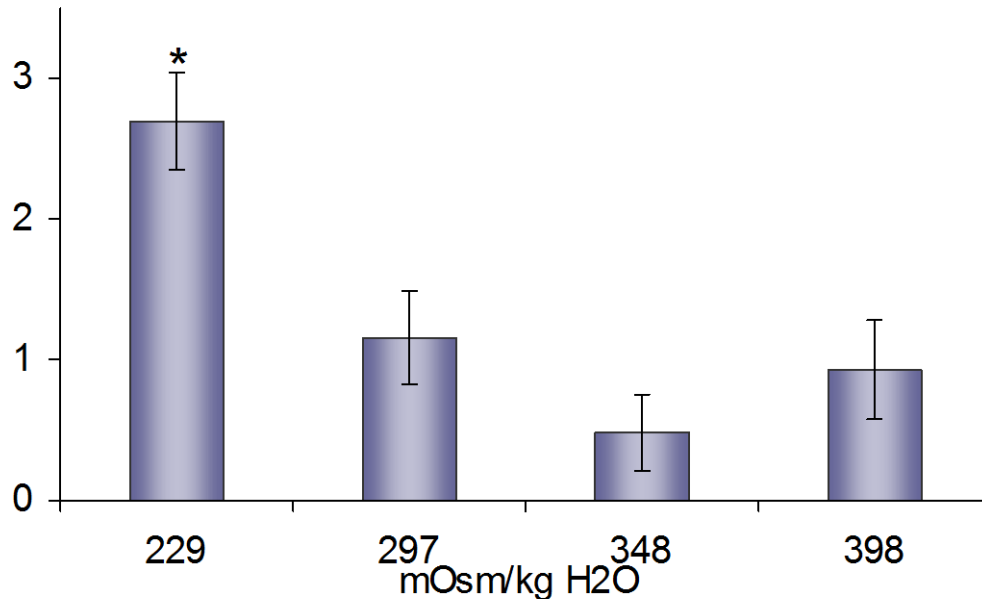


Figura 5. Efecto de la osmolaridad sobre el transporte taurina dependiente de Na^+ . Las tasas iniciales (15 seg) de transporte de [^3H] taurina ($0.43 \mu\text{M}$) se midieron en microvesículas abluminales sobre el rango indicado de osmolaridades. El potencial transmembrana calculado fue de -59 mV a una temperatura de 25°C . Todos los valores son promedios de 8 determinaciones \pm SE. Se utilizó un gradiente de entrada de Na^+ (Na^+ inicial externo 50 mM , y de 0 mM el nominal interno) en cada prueba excepto en los controles donde se sustituyó el Na^+ por colina $^+$. * Indica significancia entre transportes a $229 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$ y todas las otras osmolaridades probadas. No hubo diferencias en el rango de 297 a $398 \text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$.

Desafortunadamente, nuestros estudios no incluyen la estequiometría del transporte de taurina dependiente del Na^+ . La habilidad de este transportador para concentrar taurina intracelular sería de por lo menos 10 veces para un co-transportador electroneutral $1\text{Na}^+ : 1\text{taurina}$ y de 100 veces más para un co-transportador $2\text{Na}^+ : 1\text{taurina}$.

El transporte Na^+ -dependiente de taurina ha sido previamente demostrado en preparaciones aisladas de capilares cerebrales de cerebros de rata adulta [27]. En esta preparación, el sustrato se presentó sobre el lado abluminal del capilar, y por tanto, muy probablemente representaba la actividad de la membrana abluminal. Tayarani et al. Encontraron que el transporte de taurina estaba mediado por un sistema saturable

de alta-afinidad que dependía del Na^+ con una aparente concentración media de saturación (K_m) de $27.5 \mu\text{M}$.

Nuestros estudios demostraron en forma concluyente que el transporte dependiente del Na^+ existe en la membrana abluminal, en concordancia con Tayarani et al., con una K_m de $0.7 \mu\text{M}$ (Figura 3). No pudimos demostrar el transporte dependiente de Na^+ en la membrana luminal (Figura 1). La Figura 4 presenta un resumen esquemático de nuestros resultados.

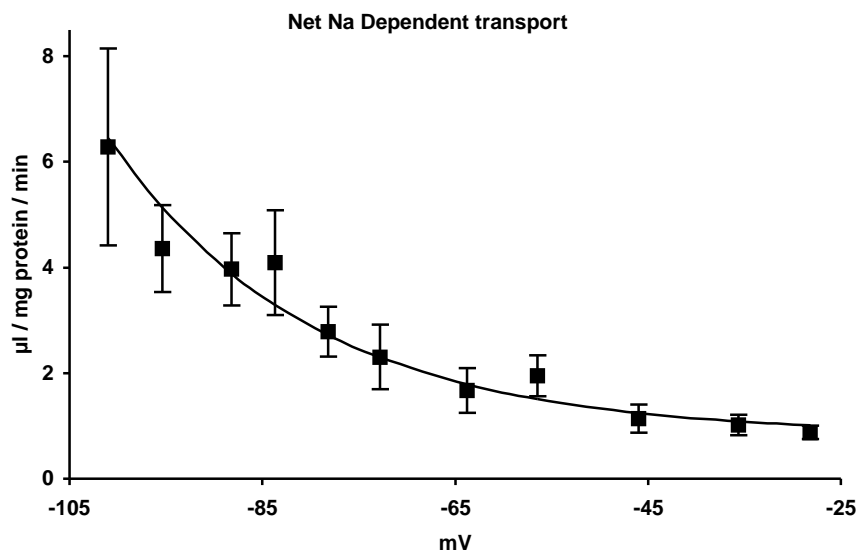


Figura 6: Transporte Na^+ -dependiente neto de taurina en membranas abluminales en función del potencial transmembrana calculado. Se incubaron microvesículas abluminales con varios volúmenes de la mezcla de reacción durante 15 seg junto con [^3H]taurina ($0.18 \mu\text{M}$). Los voltajes iniciales calculados fueron: -28.2, -35.6, -46.0, -56.5, -63.8, -72.8, -78.2, -83.7, -88.2, -95.4, -101 mV. Todos los valores son promedios de 8 determinaciones \pm SE. Se usó un gradiente Na^+ de entrada (concentración inicial externa de Na^+ 50 mM y nula concentración interna) para cada prueba excepto en los controles donde se sustituyó el Na^+ con colina $^+$. La línea corresponde al mejor ajuste a los datos por análisis de regresión lineal (Sigma Plot).

Varios estudios han demostrado que la tumefacción celular resultante de condiciones hypo-osmóticas hace que la taurina sea liberada de los astrocitos, neuronas y otras células cerebrales [5, 6, 10, 16, 17, 19, 23]. En ausencia de una vía de regreso a la circulación, la taurina se acumularía en el líquido intersticial y seguiría actuando como un osmolito. Para reducir el contenido total de osmolitos en el cerebro y con ello evitar la tumefacción, debe existir una vía de regreso a la sangre. Nuestros resultados indican que el gradiente de Na^+ es la principal fuente de energía para mover la taurina del líquido intersticial cerebral a la circulación. A este respecto, es de notarse que la tasa de transporte Na^+ -dependiente de la taurina a nivel abluminal aumentó bajo condiciones hypo-osmóticas (Figura 5).

Existen tres posibilidades para explicar esta observación. Primero, la tumefacción osmótica y su encogimiento puede, respectivamente, disminuir o aumentar la concentración intracelular de Na^+ y, por tanto, aumentar o disminuir respectivamente el gradiente químico del Na^+ para entrar a la célula. Segundo, la tumefacción osmótica o su encogimiento puede afectar el potencial de membrana debido a disminuciones o aumentos, respectivos, en la concentración intracelular de K^+ [1]. Esta posibilidad, sin embargo, no explica nuestros resultados porque la depolarización esperada de la tumefacción de la célula podría haber inhibido el co-transporte dependiente del Na^+ (Figura 6) en lugar de haber producido la estimulación observada (Figura 5). La tercera posibilidad es que los cambios en el volumen de la célula pueden alterar directamente el transporte del co-transportador dependiente del Na^+ , quizás afectando al sensor del volumen celular, tal como la aglomeración macromolecular intracelular [24]. Esta es una posibilidad intrigante desde la perspectiva teleológica ya que sería deseable prevenir la acumulación excesiva de taurina en el líquido intersticial, una vez que esta molécula ha sido liberada para prevenir la tumefacción neuronal bajo condiciones hiposmóticas (por ej., hiponatremia). Por tanto, los sistemas de transporte combinados de las membranas luminal y abluminal pueden jugar un papel activo en la regulación de la concentración de la taurina en el líquido intersticial del cerebro.

Nuestros resultados indican que el transporte Na^+ -dependiente de taurina es sensible al potencial de membrana, siendo activado por la hiperpolarización e inhibido por la depolarización (Figura 6). Podría esperarse dependencia del voltaje de un transportador electrogénico. Para el caso del transporte de taurina dependiente del Na^+ , podría resultar la electrogenicidad de la estequiometría de por lo menos 2 iones de Na^+ por molécula transportada de taurina. Por el otro lado, la sensibilidad al voltaje también podría presentarse en un transportador electroneuro [20] siempre y cuando la limitante de la tasa del mecanismo de translocación iónico sea sensible al voltaje. Esto podría ocurrir si, por ejemplo, el transportador tuviese cargas netas que no se tamizan completamente por los solutos cargados transportados.

El grupo de Tamai [26] reportó que la captación de taurina a través de ambas membranas, luminal y abluminal, dependía de la presencia tanto de Na^+ y Cl^- . Además, basados en análisis cinéticos, ellos propusieron una estequiometría de $2\text{Na}^+ + 1\text{Cl}^- : 1$ taurina. Existen dos puntos que están en aparente conflicto con los resultados presentados aquí. Primero, Tamai et al., reportaron la presencia del transporte de taurina dependiente del Na^+ en las membranas luminal y abluminal, mientras que nuestros datos (Figuras 1 y 2) sólo indican la presencia de tal transporte en la membrana abluminal. Esta discrepancia podría resultar de las diferentes características entre ambas preparaciones experimentales. Es cuestionable, por ejemplo, si la preparación celular usada por Tamai et al., realmente se asemeja a la BHE, puesto que no se mostró si esta preparación tenía una alta resistencia a través de las capas celulares o que las células fuesen polares. Un segundo resultado que podría parecer contradecir los nuestros es el hecho de que la estequiometría propuesta por el grupo de Tamai resultaría en un transportador electroneutral, mientras que nuestros resultados muestran una dependencia del voltaje para el transporte dependiente de Na^+ . En realidad, estos resultados aparentemente contradictorios no son incompatibles puesto que, como se mencionó antes, un transporte electroneutral puede aún ser sensible al voltaje. Es

también pertinente tomar en cuenta que la estequiometría propuesta por el grupo de Tamai se basa solamente en consideraciones cinéticas (es decir, determinación de los números de Hill) y, por tanto, esta estequiometría es tan solo sugestiva en el mejor de los casos. La evidencia directa, no controversial, podría obtenerse por la medición directa de los flujos acoplados de todos los iones involucrados utilizando, por ejemplo, radio-trazadores [21].

Finalmente, otra consideración importante del reporte de Tamai es la posible participación del transporte Cl^- en el transporte de taurina dependiente de Na^+ . La envergadura de nuestros estudios no comprendía la evaluación de un posible papel del Cl^- en el proceso de transporte, y nuestros resultados no apoyan ni contradicen tal involucro. Sin embargo, el grupo de Tamai propuso el transporte de Cl^- por el transporte Na^+ -dependiente de taurina basado en la observación de que al remover el Cl^- se inhibía el transporte, debe mantenerse en mente que la inhibición del transporte de taurina por remoción de cualquier ion, tal como el Cl^- , no constituye prueba de que este ion realmente sea co-transportado con la taurina. La remoción del Cl^- podría inhibir el transporte de taurina debido a un efecto secundario sobre el potencial de membrana y el volumen celular, el cual mostramos aquí que afecta el transporte de taurina. La demostración del co-transporte de Cl^- necesitaría la medición pertinente de la translocación simultánea de iones a través de la membrana. Desde luego, se requiere un esfuerzo significativo adicional para determinar la estequiometría real y la regulación del transporte de taurina a través de la BHE.

REFERENCIAS

1. Berman, D. M., Pena-Rasgado, C. and Rasgado-Flores, H. (1994) *J Exp Zool.* **268**: 97-103.
2. Bradford, M.M. (1976) *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
3. Cammann, K. (1985) *Top Curr Chem.* **128**: 219-258.
4. Franco, R., Quesada, O., and Pasantes-Morales, H. (2000) *J Neurosci Res.* **61**: 701-711.
5. Haskew-Layton, R. E., Rudkouskaya, A., Jin, Y., Feustel, P. J., Kimelberg, H. K., and Mongin, A. A. (2008) *PLoS ONE.* **3**: e3543.
6. Haugstad, T. S., Valo, E. T. and Langmoen, I. A. (1995) *Neurol Res.* **17**: 402-408.
7. Hawkins, R. A., O'Kane, R. L., Simpson, I. A. and Viña, J. R. (2006) *J Nutr.* **136**: 218S-226S.
8. Hawkins, R. A., Peterson, D. R. and Viña, J. R. (2002) *IUBMB Life* **54**: 101- 107.
9. Hille, B. and Sunderland, M.A: *Sinauer Associates*, 1992.
10. Hoffmann, E.K. (1992) *Can J Physiol Pharmacol.* **70** Suppl: S310-313.
11. Huxtable, R.J. (1992) *Physiol Rev.* **72**: 101-163.
12. Kido, Y., Tamai, I., Nakanishi, T., Kagami, T., Hirose, I., Sai, Y. and Tsuji, A. (2002) *Drug Metab Pharmacokinet* **17**: 34-41.
13. Moran, J., Sanchez-Olea, R. and Pasantes-Morales, H. (1992) *Adv Exp Med Biol.* **315**: 385-389.

-
14. Pardridge, W. M., Eisenberg, J. and Yamada, T. (1985) *J Neurochem.* **44**: 1178-1184.
 15. Pasantes-Morales, H., Chatagner, F. and Mandel, P. (1980) *Neurochem Res.* **5**: 441-451.
 16. Pasantes-Morales, H., Franco, R., Ordaz, B. and Ochoa, L.D. (2002) *Arch Med Res.* **33**: 237-244.
 17. Pasantes-Morales, H. and Martin del Rio, R. (1990) *Prog Clin Biol Res.* **351**: 317-328.
 18. Pasantes-Morales, H. and Tuz, K. (2006) *Contrib Nephrol.* **152**: 221-240.
 19. Phillis, J. W. and O'Regan, M. H. (2003) *Adv Exp Med Biol.* **526**: 433-444.
 20. Rasgado-Flores, H., Espinosa-Tanguma, R., Tie, J. and DeSantiago, J. (1996) *Ann N Y Acad Sci.* **779**: 236-248.
 21. Rasgado-Flores, H., Santiago E. M. and Blaustein M. P. (1989) *J Gen Physiol* **93**: 1219-1241.
 22. Schousboe, A. and Pasantes-Morales, H. (1992) *Can J Physiol Pharmacol.* **70** Suppl: S356-361.
 23. Schousboe, A., Sanchez-Olea, R., Moran, J. and Pasantes-Morales, H. J. (1991) *Neurosci Res.* **30**: 661-665.
 24. Summers, J. C., Trais, L., Lajvardi, R., Hergan, D., Buechler, R., Chang, H., Pena-Rasgado, C. and Rasgado-Flores, H. (1997) *Am J Physiol.* **273**: C360-370.
 25. Sánchez del Pino, M. M., Hawkins, R. A. and Peterson, D. R. (1992) *J Biol Chem.* **267**: 25951-25957.
 26. Tamai, I., Senmaru, M., Terasaki, T. and Tsuji, A. (1995) *Biochem Pharmacol.* **50**: 1783-1793.
 27. Tayarani, I., Cloez, I., Lefauconnier, J. M. and Bourre, J. M. (1989) *Biochim Biophys Acta.* **985**: 168-172.
 28. Urquhart, N., Perry, T. L., Hansen, S. and Kennedy, J. (1974) *J Neurochem.* **22**: 871-872.

SEMBLANZA DEL DR. HECTOR RASGADO FLORES



El Dr. Rasgado es originario de México. Su padre era un campesino de Oaxaca, México, que logró convertirse en concertista de la orquesta Sinfónica de Oaxaca, así como un cirujano plástico reconocido. Inspirado por su padre, el Dr. Rasgado-Flores estudió medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México, así como piano y composición musical en la Escuela Nacional de Música de la Ciudad de México y en la Escuela Real de Música en Londres. Posteriormente, estudió un doctorado en Neurociencias en el Centro de Estudios Avanzados (CINVESTAV) en la Ciudad de México y en la Universidad de Maryland. Posteriormente, se llevó a cabo una formación de post-doctorado en el transporte de la membrana celular en el Laboratorio de Biología Marina de Massachusetts.

En la actualidad es Profesor Asociado en el Departamento de Fisiología y Biofísica de la Universidad Rosalind Franklin de Medicina y Ciencia en el norte de Chicago.

Entre sus principales logros como científico es la publicación de numerosos artículos científicos originales publicadas en revistas científicas arbitradas. Estas publicaciones incluyen la caracterización de los mecanismos por los cuales las células transportan calcio y magnesio a través de sus membranas, así como el mecanismo por el cual las células sensan su volumen celular. Su investigación ha sido financiada por los Institutos Nacionales de Salud, la Asociación Americana del Corazón, Novartis Pharmaceuticals y la Fundación de Fibrosis Quística.

Como educador desarrolló una presentación-concierto multimedia titulada "Cerebro, Música y Ciencia", que le llevó a ser reconocido con el premio " Profesor Santiago Ramón y Cajal " en 2011 por la Universidad Nacional Autónoma de México. También ha recibido en dos ocasiones el premio Golden Apple por su enseñanza en la Universidad Rosalind Franklin, y en 2012 fue nombrado "Maestro" por esta Universidad.

Ha sido Presidente del Comité Internacional de Fisiología de la American Physiological Society, Miembro del Comité Nacional de EE.UU. de la Unión Internacional de Ciencias Fisiológicas, y Presidente del Consejo de Investigación de la Asociación Americana del Corazón.

Como promotor de la ciencia en América Latina, fundó la Sociedad de Biofísicos de América Latina, y también se desempeñó como su presidente. Él desarrolló el proyecto latinoamericano iniciativa de la American Physiological Society, que ha apoyado más de 30 simposios en varios países de América Latina, incluyendo México, Brasil, Argentina, Perú, Puerto Rico, Chile, Venezuela y Guatemala

Como promotor de la educación de los hispanos en los EE.UU., desarrolló el programa INSPIRE de la Universidad Rosalind Franklin. Este programa pretende acercar a los estudiantes de las minorías a la educación superior. Este trabajo ha sido reconocido al recibir una beca de la Fundación Kerr y el Premio de Liderazgo Educativo de la Coalición de Latinos Unidos del Condado de Lake, Illinois



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVI, 39 – 50, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

METABOLISMO DEL ZINC Y LAS METALOTIONEINAS EN LOS PROCESOS QUIRURGICOS

METABOLISM OF ZINC AND METALLOTHIONEINS IN SURGICAL PROCEDURES.

Eduardo Brambila y Violeta Luna Aburto

Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue. México
eduardobrambila1@yahoo.com.mx

Resumen

Posterior a un proceso quirúrgico se desarrollan una serie de cambios neurológicos, inflamatorios y metabólicos conocidos como “Respuesta de Estrés”. Durante los cambios neurológicos se liberan hormonas catabólicas que permiten proveer sustratos energéticos provenientes de carbohidratos, proteínas y lípidos. A la par, se desarrolla una respuesta inmune-inflamatoria en el sitio de la lesión conocida como reacción de fase aguda en donde se produce una reprogramación en la expresión de genes y cambios en el metabolismo en respuesta a la señalización de citocinas inflamatorias. En la respuesta de fase aguda el zinc plasmático se redistribuye al hígado mediante transportadores, la concentración de metalotioneína hepática incrementa y se produce una síntesis diferencial de las isoformas de esta proteína. Los

cambios descritos forman parte de la respuesta estrés y tienen un papel muy importante en el retorno a la homeostasis durante las cirugías.

Palabras clave: Cirugía, zinc, metalotioneina

Abstract

After surgical trauma, organisms develop neuroendocrine, inflammatory and metabolic changes known as “stress response”. During neuroendocrine changes are released catabolic hormones to provide energetic substrates from carbohydrate, protein and fat stores. At the same time in surgery is produced an immune-inflammatory response by the tissue damage known as acute phase response, in which there are a gene expression reprogramming and metabolic modifications as a consequence in signaling pathways by inflammatory cytokines. In the acute phase response, zinc is redistributed from plasma to liver with the participation of transporters, liver metallothionein increase, and metallothionein isoforms show a differential synthesis. Changes in “stress response” elicited by the organisms after surgery have an important role in the return of the homeostasis.

Keywords: Surgery, zinc, metallothionein

INTRODUCCIÓN

Después de un trauma o daño tisular, los mamíferos desarrollan una serie de cambios neurológicos, inflamatorios y metabólicos conocidos como “Respuesta de Estrés” (RE). Los procesos quirúrgicos han sido empleados para estudiar los cambios bioquímicos y fisiológicos en respuesta a los procesos inflamatorios, debido a que estos pueden ser observados a tiempos perfectamente definidos desde la etapa de inicio hasta el recobro de los individuos afectados, además de que los cambios metabólicos son similares en otros procesos inflamatorios como traumas, quemaduras, infecciones severas y ejercicio extremo. La magnitud de los cambios bioquímicos en respuesta al proceso inflamatorio producidos en una cirugía depende de los eventos preoperatorios que conducen a la cirugía, la severidad del trauma quirúrgico y también las complicaciones post-quirúrgicas. En general, los cambios sistémicos que se han descrito a consecuencia de un proceso quirúrgico se describen a continuación:

Cambios Neuroendócrinos. La RE en las cirugías se caracteriza por un incremento en la activación del eje hipotalámico-pituitaria y el sistema nervioso simpático a consecuencia de una señalización de los nervios aferentes desde el sitio de la lesión o trauma.

La estimulación del hipotálamo resulta en la secreción incrementada de catecolaminas desde la medula adrenal y la liberación de norepinefrina desde las terminales nerviosas presimpáticas. El incremento de adrenalina resulta en los conocidos efectos cardiovasculares que incluyen taquicardia e hipertención, además de la modificación funcional de ciertos órganos como hígado, páncreas y riñón. En riñón se libera renina causando la conversión de angiotensina I a angiotensina II, esta última estimula la secreción de aldosterona desde corteza adrenal incrementando la reabsorción de sodio por túbulo contorneado distal.

La liberación de hormonas pancreáticas también sufre modificaciones, es característico de los procesos quirúrgicos un incremento del glucagón plasmático, acompañado de una disminución en la secreción pancreática de insulina. Los incrementos de glucagón en las cirugías promueve la utilización de glucógeno hepático y muscular, lo que lleva a un incremento en las concentraciones plasmáticas de glucosa y lactato, así como a la movilización de ácidos grasos libres desde los depósitos grasos.

La pituitaria anterior es controlada por factores hipotalámicos de liberación o inhibición, los cuales son secretados al sistema portal hipotalámico-hipofiseal.

En respuesta a la presencia del factor de liberación hipotalámica (FLH), factor de liberación de corticotrofina (FLC) y somatotrofina, la glándula pituitaria sintetiza hormona adrenocorticotrófica (ACTH), hormona de crecimiento (HC) y prolactina (PL). La pituitaria posterior produce arginina vasopresina, la cual tiene una función mayor como hormona antidiurética.

En las etapas iniciales de los procesos quirúrgicos, la ACTH que es liberada desde la glándula pituitaria anterior estimula la secreción de cortisol. El cortisol tiene efectos importantes sobre el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, promueve el catabolismo proteico y la gluconeogénesis en hígado, favoreciendo un incremento de glucosa sanguínea. Además, el cortisol promueve la lipólisis, incrementando los precursores gluconeogénicos como el glicerol. La liberación de cortisol tiene efectos antiinflamatorios al inhibir la acumulación de macrófagos y neutrófilos en las áreas de inflamación e interfiere con la síntesis de mediadores inflamatorios, particularmente prostaglandinas. Otras hormonas, como las tiroideas y gonadotrofinas muestran cambios en las etapas posteriores a los estímulos quirúrgicos (Tabla 1).

Tabla 1. Respuestas Hormonales en las Cirugías

Glándula Endócrina	Hormonas	Cambios en la secreción
Pituitaria Anterior	Hormona Adrenocorticotrofica	Incrementa
	Hormona de Crecimiento	Incrementa
	Hormona Estimulante de la Tiroides	Incrementar o disminuir
	Hormonas Folículo Estimulante	Incrementar o disminuir
Pituitaria Posterior	Hormona Luteinizante	Incrementar o disminuir
	Arginina-Vasopresina	Incrementa
	Cortisol	Incrementa
Páncreas	Aldosterona	Incrementa
	Insulina	Incrementa
	Glucagón	Incrementa
Tiroides	Tiroxina, triiodotironina	Disminuye
		Incrementa
		Disminuye

Tomado de Desborough JP [1]

El efecto neto de la respuesta endocrina a los procesos quirúrgicos es el incremento en la secreción de hormonas catabólicas que tiene como finalidad proveer sustratos energéticos provenientes de carbohidratos almacenados y de aquellos sintetizados a partir del catabolismo de las proteínas y a partir de lípidos. Desde un punto evolutivo, es probable que la “respuesta de estrés” sea un mecanismo de supervivencia que permite que los “animales” sean sostenidos por si mismos hasta que las lesiones sean sanadas, para lo cual emplean combustibles corporales y retienen sal y agua [1, 2].

Respuesta Inmune Inflamatoria

Además de la respuesta neuroendócrina descrita en el apartado anterior, durante la RE del trauma quirúrgico se desarrolla una respuesta inmune-inflamatoria en el sitio de la lesión, la que es seguida por una respuesta anti-inflamatoria compensatoria. La inflamación es una respuesta inmune esencial que es activada por diversos estímulos infecciosos y lesiones tisulares. La reacción inflamatoria aguda tiene un inicio rápido y de corta duración, y el objetivo de esta respuesta es restaurar la homeostasis y eliminar la causa de su perturbación [3, 4, 5].

Un proceso inflamatorio agudo comprende reacciones tanto localizadas como generalizadas, la reacción inflamatoria localizada se caracteriza por la presencia de tumefacción, enrojecimiento, calor, dolor y pérdida de la función en la zona del daño, estos signos reflejan los 3 fenómenos principales de la reacción inflamatoria: vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y afluencia de fagocitos. La duración y la intensidad de la reacción inflamatoria aguda local debe ser regulada para controlar la lesión tisular y facilitar los mecanismos necesarios para que los tejidos

retornen a la homeostasia. Esta reacción inflamatoria se acompaña de una respuesta sistémica o general, conocida como reacción de fase aguda (RFA) en donde se produce una reprogramación rápida de expresión de genes y cambios en el metabolismo en respuesta a la señalización de citocinas inflamatorias [5,6].

Las citocinas son un grupo de proteínas de baja masa molecular que incluyen interleucinas e interferones. Estas son producidas por leucocitos activados, fibroblastos y células endoteliales en respuesta al daño tisular producido en las cirugías y tienen una función clave en la mediación de la inmunidad y la inflamación. Las principales citocinas liberadas son la interleucina-1 (IL-1), IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α). La respuesta al daño inicia con la liberación de IL-1 y TNF- α desde los macrófagos y monocitos que son activados en el sitio de la lesión y estas citocinas estimulan a su vez la producción y liberación de más citocinas, particularmente IL-6, la principal citocina responsable de la inducción de los cambios sistémicos en la RFA [7].

Tabla 2. Características de la Respuesta de Fase Aguda

Fiebre
Granulocitosis
Producción de Proteínas de Fase Aguda
 Proteína C Reactiva
 Fibrinógeno
 α -2-macroglobulina
Cambios en la Concentración de Proteínas de Transporte
 Incremento de Ceruloplasmina
 Disminución de Transferrina y Albúmina
Cambios en la Concentración de Cationes Divalentes
 Incremento de Cobre
 Disminución de Zinc y Hierro

Tomado de Desborough JP (1)

Durante esta RFA se produce la síntesis y liberación a circulación de proteínas hepáticas conocidas como Proteínas de Fase Aguda (PFA) que actúan como mediadores inflamatorios y anti-proteinasas. Las PFA incluyen a la proteína-C reactiva, fibrinógeno, α_2 -macroglobulina y otras anti-proteasas. Otras proteínas como la albúmina y transferrina disminuyen durante la RFA. Además de los cambios proteicos observados en la RFA, también se ha descrito que la concentración de ciertos cationes como hierro y zinc disminuyen (Tabla 2) [1,8].

ZINC Y METALOTIONEINAS EN LOS PROCESOS QUIRURGICOS

El zinc es el segundo metal más abundante en los organismos, aproximadamente de 2 a 4 g de este metal son distribuidos en todo el cuerpo humano, la mayoría de este metal se encuentra localizado en cerebro, músculo, hueso, próstata, ojos e hígado. Con la finalidad de estudiar el papel del zinc en la recuperación de las heridas después de los procesos quirúrgicos en ratas, Pories en 1967 encontró que la cicatrización de estas heridas fue mucho más rápida en animales alimentados con dietas suplementadas con zinc, en comparación con aquellos sin suplementados con este metal. Estudios posteriores en humanos demostraron que la curación de úlceras en las extremidades, fue más rápida en pacientes con niveles bajos de zinc sérico, pero que fueron suplementados con el biometal, resultados que muestran la importancia del zinc en los procesos de reparación de heridas [9].

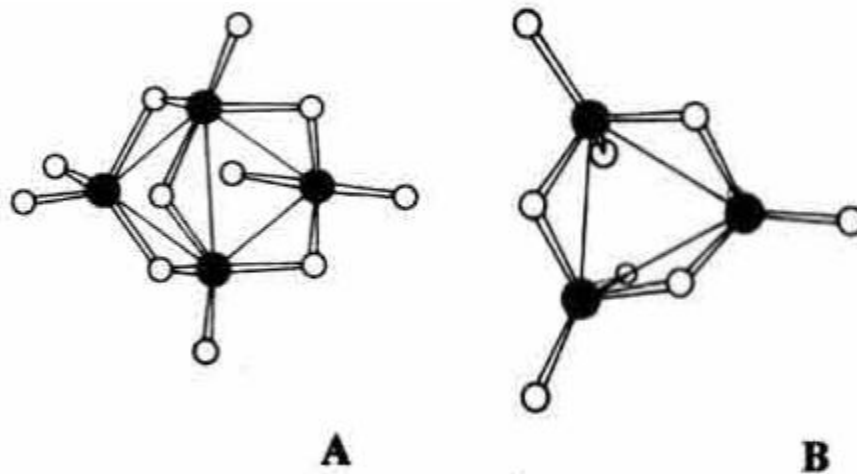


Figura 1. Estructura de los dominios globulares α y β donde se muestran los ángulos tetraédricos de interacción entre los grupos sulfhidrilos y los metales. A) dominio α , 11 cisteínas captan 4 átomos de un metal divalente. B) dominio β , 9 cisteínas captan 3 átomos de un metal divalente.

Okada y col. en 1990 mostraron que durante las etapas tempranas de los procesos quirúrgicos, el zinc se acumula alrededor de las lesiones, en donde toma lugar la división celular [8].

Además de la acumulación de zinc en los sitios de la lesión, se ha demostrado que este biometal también muestra una redistribución hacia diferentes órganos. Estudios previos han mostrado que en los procesos inflamatorios por diferentes agentes inflamatorios, el zinc es capaz de pasar desde plasma hacia hígado, explicando así, al menos en parte, la hipozinquemia observada en la RFA [10,11]. Particularmente a las 20 h de la inflamación producida por un proceso quirúrgico abdominal en ratas se produce un cuadro hipozinémico acompañado del incremento

de zinc en hígado [12]. Recientemente en nuestro laboratorio Aline y col. han descrito que, además de la redistribución de zinc desde plasma a hígado a consecuencia de un proceso quirúrgico, este metal también se distribuye a diferentes organelos de los hepatocitos. Inmediatamente después de un proceso quirúrgico abdominal en ratas, los niveles de zinc nuclear, así como el zinc citoplasmático de los hepatocitos estudiados incrementan significativamente.

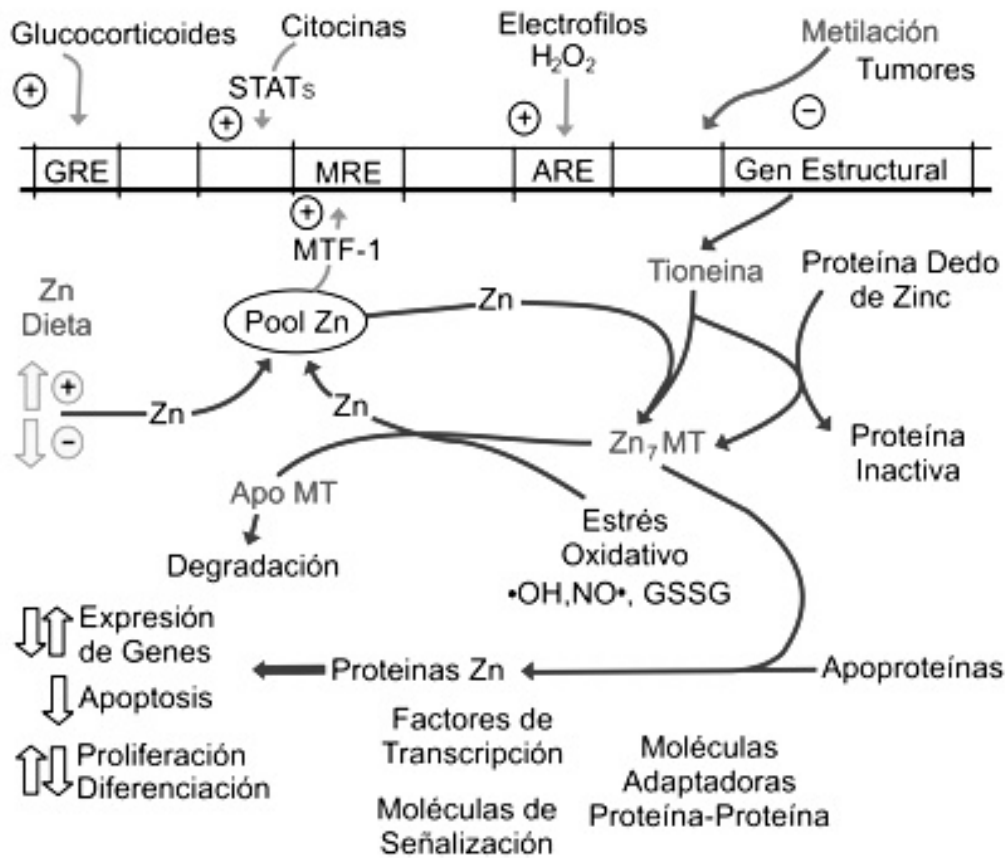


Figura 2. Panorama general de la regulación de los genes de metalotioneína (MT) y función. Elementos de respuesta que regulan positivamente la transcripción de MT. Estos incluyen los Elementos de respuesta a metales (MRE), Elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), elementos activados por STAT (Transductores de señales y activadores de transcripción) y Elementos de respuesta a antioxidantes (o electrófilos) (ARE).

Liuzzi y col. en 2005 propusieron que durante la inflamación, en la redistribución de zinc desde plasma a hígado podrían estar involucrados mecanismos mediados por transportadores de zinc. Para corroborar su hipótesis, después de administrar a ratones lipopolisacárido (LPS) y turpentina como agentes inflamatorios, evaluaron los transcritos de dos familias de genes que codifican para transportadores de exportación de zinc, ZnT, e importación de zinc, Zip, y evaluaron su expresión hepática a las 16 h de inducido el proceso inflamatorio. Sus resultados mostraron que el ARNm del

transportador Zip 14, encargado de importar zinc hacia el interior celular fue regulado positivamente por turpentina y LPS, mostrando su participación en la captación de zinc por el hígado [11]. Debido a que la inflamación producida por LPS y Turpentina producen la liberación de IL-6, examinaron el papel de esta citocina sobre la expresión de Zip14 en ratones knockout para IL-6 (IL-6^{-/-}) administrados con Turpentina y LPS. Los resultados obtenidos mostraron que la inducción de Zip14 por estos agentes inflamatorios requieren de IL-6 para que se lleve a cabo la redistribución de zinc a hígado. Adicionalmente, mediante inmunohistoquímica mostraron que tanto en la inflamación generada con turpentina así como con LPS mostraron que la proteína de Zip14 tiene su localización en la membrana plasmática de hepatocitos [11].

Adicionalmente a los resultados de Liuzzi y col., Aburto y col., 2012, han descrito la probable participación de otros transportadores de las familias Zip y ZnT en la redistribución de zinc desde plasma a hígado, así como su distribución intracelular durante los procesos quirúrgicos. Sus resultados han mostrado que en las etapas inmediatas de una cirugía experimental en ratas, el nivel de ARNm de los transportadores de importe de zinc; Zip1, 5 y 14, localizados en membrana plasmática de los hepatocitos, incrementan significativamente, sugiriendo su participación en la redistribución de zinc desde plasma a hígado. Por otro lado, el ARNm del transportador Zip8, localizado en membrana lisosomal y cuya función es exportar zinc de estos compartimientos, también muestra un incremento, sugiriendo su participación en el mantenimiento de zinc citoplasmático. A diferencia de los transportadores de la familia Zip, en las etapas posteriores a una cirugía abdominal experimental, algunos transportadores de exporte de zinc de la familia ZnT muestran disminuciones en la cantidad de ARNm, como es el caso del transportador ZnT1 localizado en membrana plasmática de los hepatocitos y ZnT2 presente en la membrana de endosomas y lisosomas. Otros transportadores, particularmente ZnT5 y ZnT6 los que transportan zinc al interior del aparato de Golgi, en las etapas posteriores a un proceso quirúrgico se presenta una disminución de su ARNm, aunque retornan a sus niveles basales a las 12h del proceso quirúrgico. En conjunto, estos resultados sugieren un proceso encaminado a incrementar los niveles citoplasmáticos de zinc en los hepatocitos.

Se ha propuesto que la redistribución zinc desde plasma al hígado en los procesos inflamatorios permitiría la biodisponibilidad de zinc para la regulación de la gluconeogénesis, control de especies reactivas (óxido nítrico o radicales hidroxilo), activación de factores de transcripción y la síntesis hepática de PFA durante los procesos inflamatorios [11].

Metalotioneínas.

En 1957 Margoshes y Vallee describieron en riñón de caballo una proteína capaz de unir cadmio, a la cual se le dio el nombre de “metalotioneína” para indicar en esta proteína la presencia de iones metálicos (metalo-) y el alto contenido de grupos sulfhidrilo provenientes de los aminoácidos cisteína (-tioneina). Por lo que metalotioneína (MT) corresponde al nombre genérico empleado para describir a la familia de proteínas con capacidad de unir metales [13]. Las MT son proteínas de baja masa molecular (6-7 kDa) constituidas por 61-62 aminoácidos de los cuales aproximadamente el 30% corresponden al aminoácido cisteína y no contienen aminoácidos aromáticos. La elevada cantidad de grupos sulfhidrilo presentes en las MT, les confieren una gran afinidad por metales esenciales como zinc y cobre, y metales no esenciales como cadmio, mercurio y bismuto [14,15]. Los metales unidos a las MT determinan la estructura terciaria de la proteína y controlan su geometría, por ejemplo el zinc se une a las MT mediante enlaces de coordinación con una geometría tetraédrica [13].

Estructuralmente las metalotioneínas se componen por los dominios globulares denominados α y β , los que tienen diferente capacidad para asociarse a los iones metálicos. El dominio α está formado por el extremo C-terminal y contiene 11 cisteínas, mientras que el dominio β está formado por el extremo N-terminal con 9 cisteínas (Figura 1). Los 20 residuos de cisteína en la MT permiten unir un total de siete iones zinc o un total de 12 iones cobre [15].

En mamíferos se ha descrito que las MT presentan cuatro isoformas designadas como MT-1 a 4. Las isoformas 1 y 2 de las MT están presentes prácticamente en todas las células de los mamíferos, aunque la mayor expresión ocurre en hígado. La expresión de las isoformas 3 y 4 de las MT es más específica para algunos tejidos, MT-3 está presente principalmente en neuronas glutamatérgicas de cerebro, aunque también se ha encontrado en páncreas, riñón e intestino, mientras que la expresión de MT-4 ocurre en células del epitelio escamoso de piel y lengua.

En humanos, los genes de las MT son agrupados dentro de la región q13 del cromosoma 16 e incluye a 11 genes para la expresión de MT-1 (MT1A, -B, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K, -L y -X), MT-2 (también conocida MT-2A), MT-3 y MT-4 [15].

Trabajos previos han mostrado que la síntesis de las MT es inducida in vitro por citocinas e in vivo, la MT hepática es inducida por la liberación de hormonas de estrés y citocinas después de la infección y daño tisular (Figura 2). Con base en la similitud entre los inductores de la síntesis de PFA y MT, en la actualidad las MT se consideran como proteínas de estrés o PFA [16].



Figura 3. Mecanismo propuesto para la redistribución de Zinc desde plasma a hígado. A) Inducción de la síntesis de MT-II por hormonas y citocinas en las primeras etapas del proceso quirúrgico (<16h), B) Redistribución de zinc a hígado mediado por transportadores de importación del metal. En esta etapa MT-I y II están presentes y su expresión depende de mediadores inflamatorios y la presencia de zinc.

En las etapas inmediatas de un proceso quirúrgico abdominal en ratas se ha descrito que las MT incrementan significativamente a las 9h llegando a su concentración máxima a la 12 h, después de este tiempo, la cantidad de MT disminuye lentamente hasta las 24 h sin llegar a su nivel basal. No obstante que el zinc es un inductor efectivo de la síntesis de MT, en los procesos quirúrgicos el zinc incrementa hasta las 20 h, por lo que la síntesis de MT en las primeras 12 h es inducida por la presencia de factores no metálicos como hormonas y citocinas. Este concepto es reforzado por el comportamiento de las isoformas de las MT hepáticas después de la cirugía. En las primeras 12 h después de la cirugía, la MT-2 se encuentra mayormente presente, mientras que a las 20h la isoforma en mayor proporción es la MT-1. Klaassen y Lehman-Mckeeman han reportado que las ratas tratadas con zinc inducen preferencialmente a la MT-1, mientras que el tratamiento con glucocorticoides sintéticos induce a la MT-2. Aunado a lo anterior, en trabajos previos se ha descrito que durante la etapa inmediata de una cirugía abdominal se produce un incremento de los niveles

plasmáticos de IL-1, IL-6, adrenalina, corticoesterona y glucagón y que la inhibición de las vías de señalización de las interleucinas y el uso de inhibidores hormonales específicos administrados antes de realizar un proceso quirúrgico, produce la disminución en la síntesis hepática de MT (comunicación en prensa). Con base en la información descrita, podemos postular que la redistribución de zinc desde plasma a hígado y las MT posteriores a los procesos quirúrgicos puede ser el resultado de dos eventos:

1. Un incremento de MT-2 en la etapa temprana en respuesta al proceso quirúrgico (<16h), que es condicionado por hormonas (adrenalina, corticoesterona y glucagón) y citocinas (IL-1 y -6) liberadas desde el sitio de la lesión.
2. Una redistribución de zinc a hígado mediado por el incremento de transportadores de importación de zinc a los hepatocitos. En esta etapa la expresión de las isoformas de MT depende de los mediadores inflamatorios y de la presencia intracelular de zinc (Figura 3).

El papel que juega el proceso hipozinquémico, así como el incremento hepático de zinc en las etapas posteriores de los procesos quirúrgicos aun no esta completamente aclarado, sin embargo se ha propuesto que este comportamiento puede tener varios efectos benéficos: 1) la disminución plasmática de zinc puede modular la función leucocitaria, incluyendo la producción de citocinas, 2) El incremento hepático de zinc puede facilitar los procesos metabólicos durante la respuesta de fase aguda y 3) El incremento de MT permite secuestrar el zinc en exceso el cual podría tener un efecto inhibitor sobre la actividad de enzimas clave. Por otro lado, el incremento controlado de zinc intracelular puede favorecer la activación de enzimas dependientes de zinc o alternativamente activar factores de transcripción favoreciendo así la síntesis de las proteínas necesarias para retornar a la homeostasis a los individuos afectados por los procesos inflamatorios.

REFERENCIAS.

1. Desborough, J. P. (2000). *Br. J Anaesth.* **85** :109-117.
2. Burton, D., Nicholson, G. y Hall, G. (2004) *Critical Care & Pain* **4**: 144-147.
3. Moshage, H. (1997) *J. Pathol.* **181**: 257-66.
4. Medzhitov, R. (2010) **140**: 771-776.
5. Venteclef, N., Jakobsson, T., Steffensen, R. K. and Treuter, E. (2011) *Metabolic Trends Endocrinol. Metab.* **22**: 333-343.
6. Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A., Koopmans, S. J. (2005) *J. Zhejiang Univ. Sci.* **6B**: 1045-1056.
7. Sheeran, P. and Hal, I. G. M. (2000) *Br. J. Anaesth.* **78**: 201-219.
8. Okada, A., Takag,i Y., Nezu, R. and Lee, S. (1990) *Jpn J Surg* **20**: 635-644.

9. Pories, W. J., Henze, J. H., Rob, C.G. and Strain, W. H. (1967) *Ann. Surg.* **65**: 432-436.
10. Cousins, R. J. and Leinart, A. S. (1988) *FASEB J.* **2**: 2884–2890.
11. Liuzzi, J. P., Lichten, L. A., Rivera, S., Blanchard, R. K., Aydemir, T. B., Knutson, M. D., Ganz, T. and Cousins, R. J. (2005) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 6843-6868.
12. Brambila, E., Sánchez, J. L., Albores, A. and Waalkes, M. (1999) *Biol. Trace Elem. Res.* **70**: 173-182.
13. Maret, W. (2011) *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**:1079-1086.
14. Palmiter, R. D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 1219-1223.
15. Haq, F., Mahoney, M. and Koropatnick J (2003) *Mutat. Res.* **533**: 211-222.
16. Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C. and Rofe, A. M. (2002) *Cell Mol. Life Sci.* **59**: 627-647.

Semblanza del Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres



Es Doctor en Ciencias por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Post-Doctorado en el Laboratorio de Carcinogénesis Inorgánica de los Institutos Nacionales de Salud en Estados Unidos. Previamente cursó la licenciatura en la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP y la Maestría en Ciencias en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN: Actualmente es Profesor-Investigador de la Facultad de Ciencias

El campo de trabajo del Dr. Brambila se ha desarrollado en el área de la Bioquímica, en donde se ha interesado en el estudio del comportamiento y el papel del zinc y las metalotioneinas en la fisiopatología de las enfermedades, especialmente durante los procesos inflamatorios localizados, como las cirugías.

Publicaciones representativas

Brambila, E.; Albores, A.; Muñoz-Sánchez, J.L. Waalkes, M.P. (1999): Early effect of experimental surgery on hepatic levels of zinc (Zn) and metallothioneins (MT) in female rats. *Biological Trace Element Research.* **70** (2): 21-27.

Brambila, E.; Muñoz-Sánchez, J.L.; Waalkes, M.P.; Albores, A. (2000) Effect of surgically induced cholestasis on the levels of hepatic zinc and metallothionein in rat liver. *Biological Trace Element Research* **78** (1-3): 255-264.

Guevara-Ortiz, J.M.; Omar-Castellanos, V.; León-Chávez, B.A.; Achanzar, W.E.; **Brambila, E.** (2005) Interferon- α induction of metallothionein in rat liver is not linked to interleukin-1, 6 or necrosis factor- α . *Experimental and Molecular Pathology.* **79** (1): 33-38.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVI, 51 – 64**, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

REGENERACIÓN TISULAR: EL PAPEL DE LAS CÉLULAS MADRE EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

TISSUE REGENERATION: THE ROLE OF STEM CELLS IN CARDIOVASCULAR DISEASES

Felipe Alonso Massó Rojas¹, Araceli Páez Arenas¹, Elvira Varela López¹, Luis Felipe Montaña Estrada², Salomón Desideri Hernández³, Valentín Herrera Alarcón⁴, Nydia Ávila Vazzny⁵, Rafael Vilchis⁶ y José Luis Aceves Chimal⁶.

¹Departamento de Fisiología, ⁴Departamento de Cirugía Cardíaca, ⁵Departamento de Ecocardiografía, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano 1 Col, Sección XVI Tlalpan C.P. 14080 México D.F. ²Departamento de Biología Celular y Tisular Facultad de Medicina U.N.A.M. Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, C.P. 04510, México D.F. ⁶Departamento de Cardiocirugía Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE. Av. Félix Cuevas 540 Col. Del Valle C.P. 03229 México D.F. ³Laboratorio de Biología Molecular Universidad Panamericana Escuela de Medicina Donatello 59 Col. Insurgentes Mixcoac C.P. 03920 México D.F.

Resumen

La idea de reemplazar órganos o miembros dañados ha subyugado siempre la imaginación de los seres humanos, en un intento por vivir sin ninguna discapacidad ó, tal vez, huyendo de los efectos de la vejez. En el presente trabajo trataremos de hacer una breve reseña de cómo ha evolucionado el concepto de medicina regenerativa,

desde su forma de leyenda, hasta la clonación en mamíferos haciendo hincapié en el empleo de células madre con fines terapéuticos. El origen del interés en este tipo de células y el estado actual de los conocimientos sobre las mismas incluyendo algunos datos de ensayos clínicos controlados así como de meta-análisis rigurosamente conducidos. Finalmente mostraremos solo unos cuantos datos obtenidos por nuestro grupo de trabajo y comentaremos nuestra visión sobre el futuro de este tipo de terapia.

Palabras clave: Medicina regenerativa, células madre, células troncales, regeneración cardiaca, infarto al miocardio.

Abstract

The idea to replace damaged organs or members has always subjugated the imagination of the human beings, in an attempt to live without incapacity or, perhaps, fleeing from the effects of the oldness. In the present work we will try to make a brief review of how the regenerative medicine concept has evolved, from its legend form, to the cloning in mammals with special emphasis on the use of stem cells with therapeutic aims. The origins of the interest in this type of cells and the state of the art of the knowledge about them, including some data of randomized controlled clinical trials as well as of rigorously lead meta-analysis. Finally we will show only a few data from our work group and we will comment our vision about the future of this type of therapy.

Key Words: Regenerative medicine, stem cells, cardiac regeneration, cardiac infarction.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La idea de sustituir un tejido dañado por uno sano es muy antigua, los primeros intentos de trasplante de órgano se pierden en la historia. Así, a manera de leyenda, se relata que en el siglo tercero Damián y Cosmas, trasplantaron la pierna sana de un etíope a Justiniano un diácono romano, quien sufría de gangrena, hoy en día sabemos que un trasplante exitoso de este tipo no es posible debido a la diferencias que existen en los antígenos de histocompatibilidad (HLA) entre las distintas etnias, sin embargo, este relato nos habla de la necesidad histórica por parte del ser humano de creer que un órgano puede ser reemplazado por otro.

El primer trasplante de piel parece haberlo realizado un médico hindú de nombre Sushruta en el 600 A.C., quién publicó lo que vino a ser la primera colección de textos médicos de la historia, incluyendo en ellos a la cirugía reconstructiva. Siglos después, alrededor de 1570, el Médico Italiano Gasparo Tagliacozzi considerado el padre de la cirugía plástica, realizó el primer trasplante exitoso de piel, de naturaleza autóloga, pero fracasó en el intento de efectuar alotransplantes (trasplantes entre individuos genéticamente diferentes de la misma especie) e introdujo, sin saberlo, el concepto de

rechazo, mencionado por él mismo, de una forma metafórica, como "la fuerza y el poder de la individualidad".



Damián y Cosmas



Rinoplastía de Gasparo
Tagliacozzi

En los primeros años del siglo XX, los médicos franceses Alexis Carrel y Charles Guthrie inician sus trabajos sobre trasplantes de arterias y venas, por los cuales fueron galardonados con el Premio Nobel años mas tarde. En 1905, Edward Zirm en Austria efectúa el primer trasplante de córnea en humanos.



Alexis Carrel



Edward Zirm

En 1954 el Dr. Joseph Murray llevó a cabo el primer trasplante renal entre gemelos idénticos (isoinjerto). En Diciembre 3 de 1967 el Dr. Christian Barnard realizó el primer trasplante cardiaco en Ciudad del Cabo, Sudáfrica, el receptor Louis Washkansky sobrevivió durante 18 días, el segundo paciente del Dr. Barnard, Philip

Blaiberg sobrevivió 18 meses. En 1968 ayudado por las entonces novedosas drogas inmunosupresoras, el Dr. Denton Cooley realizó 18 trasplantes incluyendo el primer trasplante corazón-pulmón, 14 de los pacientes fallecieron antes de los 6 meses posteriores al acto quirúrgico

A pesar del indudable avance tecnológico que impera en nuestros días, y del incremento en la sobrevivencia de los pacientes trasplantados, los alotrasplantes de corazón, no representan hasta la fecha una terapéutica que pueda emplearse de manera masiva en todos los individuos que lo requieren, la escasez de donadores, la necesidad de emplear drogas inmunosupresoras y el desarrollo de aterosclerosis acelerada del órgano trasplantado, limitan su utilidad.



Joseph Murray



Christian Barnard

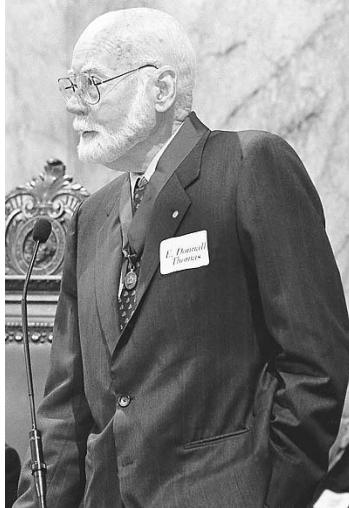


Denton Cooley

Una alternativa para el trasplante de un órgano completo, surgió al descubrirse la posibilidad del trasplante celular, esto es, trasplantar solo las células funcionales o células en estados inmaduros capaces de diferenciarse en células funcionales.

Los primeros trasplantes celulares exitosos, y de hecho los únicos universalmente aceptados como terapéutica general hasta el momento, son los de médula ósea, iniciados gracias a los estudios del Dr. Donnall Thomas en 1949 en animales experimentales y llevados al terreno clínico por él mismo, junto con el Dr. Joseph Ferrebee en 1955, inicialmente los pacientes no sobrevivieron mas de 100 días, nuevamente en estos casos, se realizaron aloinjertos. A pesar de estos primeros resultados desalentadores, la investigación continuó, dando como resultado el conocimiento de la importancia sobre la relación donador-receptor.

Hacia finales de la década de los 50's el grupo del Dr. Thomas realizó el primer trasplante de médula ósea entre gemelos idénticos que funcionó adecuadamente.



Donnall Thomas

Los conocimientos sobre histocompatibilidad y rechazo y el desarrollo de nuevas drogas inmunosupresoras condujeron a que en 1963 el Dr. George Mathé y colaboradores, efectuaran en París, el primer trasplante exitoso de células de médula ósea de donador no relacionado.

La clonación de la oveja Dolly [1] en 1997, marcó un parte aguas acerca de nuestros conocimientos sobre el proceso de diferenciación celular, pues por primera vez se pudo comprobar que a partir del núcleo de una célula adulta se podía generar un organismo completo, idéntico al donador del material genético, si se colocaba éste en un microambiente adecuado, esto es, se podía reprogramar, casi en su totalidad, el ADN de una célula adulta para transformarla en una célula totipotencial. Este descubrimiento volvió a despertar el interés por el estudio de las células pluripotenciales presentes no solo en los tejidos embrionarios, sino también en los tejidos adultos y por entender como éstas células podrían intervenir en los procesos de regeneración y reparación tisular.



Sir Ian Wilmut y Dolly

EL DESARROLLO DE LOS CONOCIMIENTOS SOBRE LAS CÉLULAS MADRE

En 1909, en Berlín, el biólogo ruso Alexander Maximov propuso que entre los linfocitos de la sangre periférica un pequeño número debería de ser capaz de poseer pluripotencialidad para generar todas las estirpes sanguíneas y denominó a estas células: “gemeinsame Stammzellen” algo así como células troncales comunes [2]. Pero no fue sino hasta el año de 1961 que Hill y McCulloch demostraron la capacidad multipotencial de las células madre de la médula ósea [3], como puede observarse esta demostración ocurrió años después de los trasplantes realizados por el Dr. Thomas, lo que nos demuestra una vez más que los fenómenos biológicos ocurren, independientemente de que nosotros como científicos podamos o no comprender del todo los mecanismos de acción que involucran.

En 1998 Shambloott y colaboradores y Thompson y colaboradores reportaron por separado el establecimiento de las primeras líneas embrionarias humanas, con capacidad de diferenciarse en cualquier estirpe celular [4, 5], esto vino a generar inmensas expectativas con respecto al uso de las células madre en lo que se ha dado en llamar la medicina regenerativa, esta fuente de células madre, sin embargo, ha sido sumamente debatida, debido a problemas de índole ético como la posibilidad teórica de generar clones semejantes a Dolly, pero en la especie humana. Por otra parte, el trasplante de tejidos o células de este origen nuevamente topan con los problemas de histocompatibilidad que se presentan en todos los aloinjertos.

Recientemente, en el año 2006, Takahashi y Yamanaka indujeron células madre pluripotenciales mediante la reprogramación genética de células somáticas (fibroblastos) de individuos adultos (iPSCs por sus siglas en inglés) empleando la transfección de los genes Oct3/4, Sox2, c-Myc and Klf4 [6], lo que abrió la puerta para obtener células madre equivalentes a las células embrionarias sin los problemas antes mencionados y con la ventaja de permitir la realización de trasplantes autólogos y así evitar los fenómenos de rechazo, aunque persiste el riesgo de la teratogenicidad, la cual es mayor en este tipo de células que en células madre obtenidas de otras fuentes.

Casi simultáneamente a la descripción de Shambloott y Thompson se demostró que células madre provenientes de tejidos adultos, en particular aquellas de origen hematopoyético, eran capaces de generar, otras estirpes celulares distintas a las células sanguíneas, entre las que se han descrito: adipocitos, células musculares, hepatocitos, neuronas y cardiomiocitos [7-11] estas primeras demostraciones de plasticidad han sido cuestionadas, sin embargo algunos estudios recientes realizados de forma mas controlada avalan esta capacidad [12-23], aunque la controversia continúa.

Las células madre, no solo las de origen embrionario, sino aquellas derivadas de cordón umbilical y las que se encuentran presentes en órganos adultos han sido sujetas a una intensa investigación, generándose grandes expectativas en su empleo en enfermedades como el infarto al miocardio, las parálisis postraumáticas, la enfermedad cerebrovascular, el mal de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes mellitus etc.

LAS CELULAS MADRE Y SU EMPLEO EN CARDIOLOGIA

De todas las fuentes posibles descritas en los párrafos anteriores, las células madre hematopoyéticas han sido, sin lugar a dudas, las más empleadas en los protocolos de regeneración en cardiología, se han utilizado como una mezcla completa de células obtenidas de la médula ósea o "cosechadas" mediante aféresis de sangre periférica después de un estímulo con Factor de Crecimiento de Granulocitos (G-CSF), o como subpoblaciones celulares purificadas o semipurificadas como células mesenquimales (CD73+ CD105+ CD166+, CD90+ etc.), precursores endoteliales (CD34+, VEGFR-2, Flk-1 etc.) o que presentan algunos marcadores más generales de estados indiferenciados como CD34+ CD133+ c-Kit+, etc. Otra posible fuente de células madre recientemente descrita de origen hematopoyético es la sangre menstrual que contiene células madre endometriales [24,25], además se ha demostrado la existencia de células madre provenientes de tumores, las cuáles resultan sumamente interesantes como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de las neoplasias, en particular de las de mayor malignidad y las que han hecho metástasis, aunque su potencial terapéutico en el campo de la medicina regenerativa por el momento parece limitado.

Los primeros experimentos sobre el uso de células madre adultas para tratar de corregir el daño celular causado por un infarto al corazón inducido por lesión criogénica del miocardio en el ratón, fueron publicados en el año de 1999 por Tomita y colaboradores en un modelo de infarto experimental inducido por lesión criogénica del miocardio en el ratón, utilizando células madre hematopoyéticas cultivadas *in vitro* en presencia del desacoplante 5-azacitidina [26], poco después en el año 2000 los grupos de los Doctores Piero Anversa y Bernardo Nadal-Ginard, empleando un modelo de ligadura de una arteria coronaria, produjeron también un infarto en un modelo murino y realizaron un trasplante de una subpoblación de células madre derivadas de médula ósea, que presentaba los marcadores Lin-, c-kit^{POS} [27] inyectándolas directamente en el borde de la zona infartada al poco tiempo de generado el infarto. La conclusión de este trabajo fue que las células madre presentaban la capacidad de diferenciarse en distintos tejidos, incluidos cardiomiocitos y vasos sanguíneos y ello traía aparejada una mejoría funcional del corazón de los animales de experimentación. Esta capacidad de diferenciarse en estirpes celulares distintas a las células hematopoyéticas fue conocida posteriormente como "transdiferenciación" ó "plastía celular".

El primer intento por regenerar un corazón humano después de un infarto al miocardio fue reportado en el año 2001 en Alemania por el Dr. Bodo Strauer [28], quien describe el caso de un único paciente transplantado mediante inyección coronaria de células madre autólogas. A este protocolo, le siguió otro con un grupo más grande de pacientes [29] reportando una mejoría en el tamaño del infarto y un incremento en la velocidad de movimiento de la pared infartada.

A estos primeros trabajos de orden clínico rápidamente se agregaron otros que han mostrado resultados muy variables e incluso contradictorios.

En buena medida estas diferencias pueden explicarse por lo heterogéneo de los protocolos que se han empleado para estudiar la utilidad del trasplante de células madre en el tratamiento del infarto al miocardio, desde el tiempo de aplicación de las células que varía de días a meses, la cantidad de células trasplantadas, que en muchos casos no se describe y parece ser muy variable, la falta de controles adecuados contra quienes comparar la mejoría observada, el tiempo de seguimiento, las pruebas utilizadas para definir si hay o no mejoría (fracción de expulsión, volumen telediastólico del ventrículo izquierdo, movimiento regional de la zona infartada, tamaño del infarto, mejoría en la prueba de esfuerzo, clasificación funcional, perfusión, presentación de nuevos eventos cardiovasculares, sobrevida, viabilidad, calidad de vida, isquemia, presentación de angina, etc.) todo ello documentado por técnicas que también difieren entre los distintos protocolos, como SPECT con y sin redistribución del radionúclido, PET, ecocardiografía, resonancia magnética nuclear, prueba de banda, cuestionarios, número de internamientos, etc.

Assmus reportó [30] en un grupo de 20 pacientes trasplantados, en el que las células se aplicaron de 3 a 6 días post-infarto por vía intracoronaria y observó una mejoría en la fracción de eyección, a este estudio se le denominó TOPCARE-AMI (The Transplantation of Progenitor Cells And Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction). El mismo grupo publicó el seguimiento a un año, reportando en 2004 59 pacientes, sin grupo control, aplicado las células madre entre 3 y 7 días postinfarto por vía intracoronaria, estas células fueron de 2 orígenes, de médula ósea y obtenidas mediante aféresis en sangre periférica después de una movilización con G-CSF en este trabajo se reporta una disminución del volumen telediastólico y una mejoría en la contractilidad fracción de eyección y disminución del tamaño del infarto [31]. En el año 2006 este grupo reporta además una mejoría en la reserva de flujo coronario [32]. Otro estudio importante es el BOOST publicado por Wollert en 2004 realizado en un grupo de 60 pacientes de los cuales 30 eran controles, aplicando las células entre 4 y 7 días postinfarto por vía intracoronaria, el origen de las células fue de médula ósea, y reporta una mejoría en la fracción de eyección [33]. Otros estudios controlados con resultados positivos son: el publicado por nuestro grupo en pacientes con infartos antiguos y vía de administración intracardiaca en donde demostramos una mejoría en la fracción de expulsión, en los volúmenes tele-sistólico y telediastólico, en la perfusión miocárdica y en el diámetro diastólico del ventrículo izquierdo y el engrosamiento de la pared infartada [34], el publicado por Losordo [35] y el de Klein [36].

En contraste otros trabajos no refieren ninguna mejoría, aunque algunos de ellos no han empleado realmente el trasplante de células madre sino únicamente la administración de GCS-F [37-40].

Aún cuando existen en la literatura resultados controversiales, el conjunto de datos del que disponemos actualmente, hacen pensar que la terapia celular es una alternativa real en un futuro relativamente cercano. Un meta-análisis de los estudios clínicos controlados y aleatorizados publicados hasta la fecha que incluye más de 1700 pacientes enrolados en 33 protocolos empleando las revisiones rigurosamente sistematizadas de la base de datos Cochrane hace referencia a una mejoría moderada

en la función ventricular global a corto y largo plazo, mostrando ventajas sobre el tratamiento tradicional de reperfusión cuando se emplea el trasplante autólogo de células madre, sin embargo los parámetros para incluir los estudios analizados en este trabajo no permiten ser totalmente concluyentes, pues debido a las diferencias en los protocolos de investigación muchos de ellos quedaron excluidos del estudio [41].

Recientemente se han iniciado protocolos que contemplan la aplicación de células stem residentes en el corazón, descritas inicialmente por el grupo del Dr. Piero Anversa y colaboradores [42] obtenidas mediante biopsia endomiocárdica y cultivadas *ex vivo* en estructuras que se han denominado cardioesferas, que contienen en su interior diferentes estirpes celulares y que han resultado ser sumamente prometedoras como una alternativa terapéutica tanto en modelos animales [43,44] como en ensayos clínicos iniciales [45].

Si bien es cierto que existen algunas voces entre la comunidad científica que advierten de los posibles riesgos de la técnica y hacen énfasis en suspender los ensayos clínicos, en tanto no se contesten preguntas de orden básico, como el mecanismo de acción de estos trasplantes, los cuales han sido ampliamente debatidos, desde la no existencia de la transdiferenciación o plastia celular [46], explicando la mejoría observada en los pacientes trasplantados como un efecto de la fusión celular, o el estímulo mediante citosinas de las células madre cardíacas residentes en el corazón [47], hasta el conocimiento de la célula responsable de la mejoría detectada [48], nosotros consideramos que una adecuada selección de pacientes, sobre todo de aquellos en espera de un trasplante cardíaco a los que no se les puede ofrecer una mejor alternativa terapéutica en estos momentos, un mejor diseño de los protocolos incluyendo técnicas más cuantitativas y que permitan detectar mejor la viabilidad, la motilidad, el tamaño del infarto etc. antes y después del procedimiento, enriquecerían el conocimiento del empleo de esta terapia, sin necesidad de obtener todos los conocimientos básicos, pues en los momentos actuales el número de pacientes que mueren en espera de un corazón compatible es sumamente elevado.

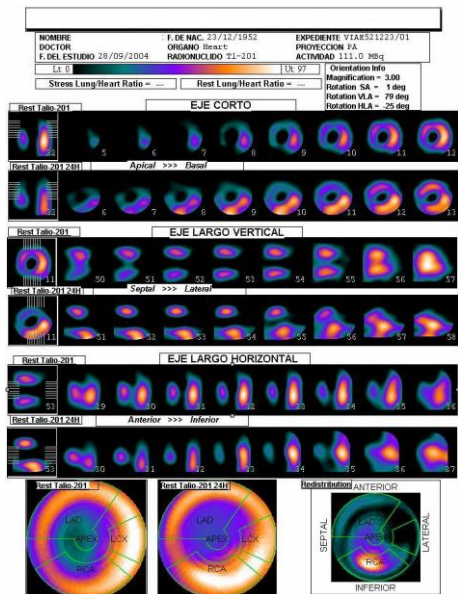
ALGUNOS RESULTADOS GENERADOS POR NUESTRO GRUPO DE TRABAJO

El presente artículo tiene como objetivo principal relatar de una manera sencilla y, esperamos que amena, los orígenes del interés sobre el estudio de la medicina regenerativa, del papel que han jugado las células madre en este campo y ubicar al lector en el punto en que se halla actualmente la investigación sobre este tema, haciendo un especial énfasis en su posible papel terapéutico en las enfermedades cardiovasculares, sin embargo quisiéramos aportar a manera de ejemplo algunos datos experimentales obtenidos por nuestro grupo de trabajo desde hace aproximadamente 10 años.

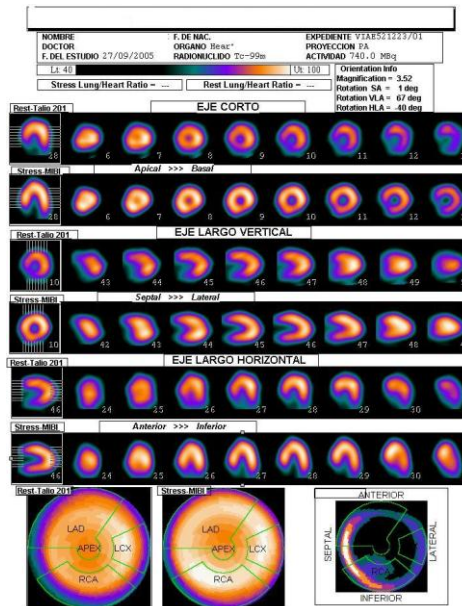
La siguiente figura representa la evolución de un paciente quien presentaba un infarto al miocardio de 18 meses de antigüedad en la región apical, la cara anterolateral y el septum después de haber sufrido un trasplante autólogo intramiocárdico de células mononucleares hematopoyéticas enriquecidas en células madre durante un proceso de revascularización quirúrgico. Se pueden observar claramente los defectos

de perfusión presentes antes del trasplante, sobre todo en la región apical y la cara inferior del corazón, mismos que se encuentran corregidos en su mayor parte a los 12 meses post-trasplante.

SPECT PRE- TRASPLANTE



SPECT 12 MESES POST-TRASPLANTE



En la tabla I puede observarse la evolución ecocardiográfica a 28 y 52 semanas de un total de 20 pacientes con infartos al miocardio de 6 o más meses de antigüedad que fueron sometidos a revascularización quirúrgica y trasplante autólogo de células mononucleares hematopoyéticas, enriquecidas en células madre movilizadas a la circulación periférica mediante el empleo de GCS-F.

Incuestionablemente, debemos seguir conociendo mejor la biología de las células madre, la forma de inducir su diferenciación hacia la estirpe o estirpes celulares que nos interesa que se desarrollen, no solo cardiomiocitos sino células que puedan hacer mas funcional al corazón, nos falta también contestar desde el punto de vista clínico cual es la mejor fuente para obtener las células madre, en que dosis es mejor aplicarlas, si una solo trasplante es suficiente o se requiere de múltiples administraciones, cuanto tiempo puede persistir la mejoría (nuestros datos preliminares nos dicen que al menos 10 años, cuando se aplica por vía intra cardiaca) si se tienen que aplicar solas o en conjunto con factores de crecimiento, en fin, el número de preguntas es aún muy grande, sin embargo regresando al aprendizaje generado por Dolly, si el núcleo de una célula adulta fue capaz de generar, no solo células de diferente estirpe, no sólo órganos o sistemas sino un individuo completo genéticamente idéntico a aquel del cuál procedía el material genético, al colocarse en un microambiente adecuado, creemos que las células madre tiene un buen futuro y solo es cuestión de mas investigación y tiempo para que se conviertan en una terapéutica generalizada.

	Pre-implante			28 semanas		52 semanas		
	Caso	Control	P	Caso	Control	Caso	Control	P
FE %	36±6	37±5	0.58	53±5	37±5	54±5	37±5	0.001
VTDVI ml	174±15	164±15	0.06	83±18	163±15	79±22	163±14	0.001
VTSVI ml	115±22	117±16	0.84	43±18	117±15	44±21	117±15	0.001
DTDVI mm	59±1.3	58±2.2	0.35	52±3	58±2.2	52±3.2	60±3	0.001

Tabla 1. Valores en porcentaje de la fracción de eyección (FE), el cuál nos indica el estado global del corazón en su función de bomba, los volúmenes tele-sistólico (VTSVI) y tele-diastólico del ventrículo izquierdo (VTDVI), los cuales nos indica el volumen de sangre que permanece en el ventrículo después de la contracción y la cantidad que puede almacenar dicho ventrículo durante la diástole antes de contraerse. Además evaluamos el diámetro tele diastólico del ventrículo izquierdo (VTDVI) que nos indica la dilatación de las paredes del mismo ventrículo.

BIBLIOGRAFIA

1. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. y Campbell, K. H. (1997) *Nature*. **385**, 810-813.
2. Maximow, A. (1909) *Folia Haematol.* **8**, 125-141.
3. Till, J. E. y McCulloch, E. A. (1961) *Radiat. Res.* **14**, 213-222.
4. Shablott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W. y Donovan, P. J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13726-13731.
5. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. y Jones, J. M. (1998) *Science*. **282**, 1145-1147.
6. Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006) *Cell*. **126**, 663-676
7. Mertelsmann, R. (2000) *J. Hematother Stem Cell Res.* **9**, 957-960.
8. Sell, S. (2001) *Hepatology*. **33**, 738-750.
9. Orkin, S.H. (2000) *Nat. Rev. Genet.* **1**, 57-64.
10. Santambrogio, L., Belyanskaya, S. L., Fischer, F. R., Cipriani, B., Brosnan, C. F., Ricciardi-Castagnoli, P., Stern, L. J., Strominger, J. L. y Riese, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6295-6300.
11. Goodell, M.A., Jackson, K.A., Majka, S.M., Mi, T., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael, L.H. y Hirschi, K.K. (2001) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **938**, 208-228.

12. Deng, J., Petersen, B. E., Steindler, D. A., Jorgensen, M. L. y Laywell, E. D. (2006) *Stem Cells*. **24**, 1054-1064
13. Keilhoff, G., Goihl, A., Langnäse, K., Fansa, H. y Wolf, G. (2006) *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 11-24.
14. Chen, Y., Dong, X. J., Zhang, G. R., Shao, J. Z. y Xiang, L. X. (2007) *J. Cell. Biochem.* **102**, 52-63.
15. Badorff, C., Brandes, R.P., Popp, R., Rupp, S., Urbich, C., Aicher, A., Fleming, I., Busse, R., Zeiher, A.M. y Dimmeler, S. (2003) *Circulation*. **107**, 1024-1032.
16. Yeh, E. T., Zhang, S., Wu, H. D., Körbling, M., Willerson, J. T. y Estrov, Z. (2003) *Circulation*. **108**, 2070-2073.
17. Sánchez, A., Fernández, M. E., Rodríguez, A., Fernández, J., Torre-Pérez, N., Hurlé, J. M. y García-Sancho, J. (2006) *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **Suppl 1**, S29-S32.
18. Khurana, S. y Mukhopadhyay A. (2008) *J Hepatol.* **49**, 998-1007.
19. Wang, D. Y., Wu, S. C., Lin, S. P., Hsiao, S. H., Cheng, T. W. y Huang. Y. Y. (2011) *Biomed. Microdevices.* **13**, 517-526.
20. Numasawa, Y., Kimura, T., Miyoshi, S., Nishiyama, N., Hida, N., Tsuji, H., Tsuruta, H., Segawa, K., Ogawa, S. y Umezawa, A. (2011) *Stem Cells*. **29**, 1405-1414.
21. Ayatollahi, M., Soleimani, M., Tabei, S. Z. y Kabir Salmani, M. (2011) *World. J. Stem Cells.* **3**, 113-121.
22. Bonora-Centelles, A., Jover, R., Mirabet, V., Lahoz, A., Carbonell, F., Castell, J.V. y Gómez-Lechón, M.J. (2009) *Cell Transplant.* **18**, 1319-1340.
23. Perán, M., Marchal, J.A., López, E., Jiménez-Navarro, M., Ovuláis, H., Rodríguez-Serrano, F., Carrillo, E., Sánchez-Espin, G., de Teresa, E., Tosh, D. y Aranega, A. (2010) *Cytotherapy.* **12**, 332-337.
24. Meng, X., Ichim, T.E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K.W., Thébaud, B. y Riordan, N.H. (2007) *J. Transl. Med.* **5**, 57.
25. Patel, A.N., Park, E., Kuzman, M., Benetti, F., Silva, F.J. y Allickson, J.G. (2008) *Cell Transplant.* **17**, 303-311.
26. Tomita, S., Li, R. K., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Kim, E. J., Sakai, T. y Jia, Z. Q. (1999) *Circulation.* **100** (19 Suppl), II247-II256.
27. Orlic, D., Kajstura, J., Chiment, i S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. y Anversa, P. (2001) *Nature.* **410**, 701-715.
28. Strauer, B.E., Brehm, M., Zeus, T., Gattermann, N., Hernandez, A., Sorg, R.V., Kögler, G. y Wernet, P. (2001) *Dtsch. Med. Wochenschr.* **126**, 932-938.
29. Strauer, B.E., Brehm, M., Zeus, T., Köstering, M., Hernandez, A., Sorg, R.V., Kögler, G. y Wernet, P. (2002) *Circulation.* **106**, 1913-1918.
30. Assmus, B., Schächinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Döbert, N., Grünwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S. y Zeiher, A.M. (2002) *Circulation.* **106**, 3009-3017.
31. Schächinger, V., Assmus, B., Britten, M.B., Honold, J., Lehmann, R., Teupe, C., Abolmaali, N.D., Vogl, T.J., Hofmann, W.K., Martin, H., Dimmeler, S. y Zeiher, A.M. (2004) *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 1690-1699.
32. Schächinger, V., Assmus, B., Honold, J., Lehmann, R., Hofmann, W.K., Martin, H., Dimmeler, S., Zeiher, A.M. (2006) *Clin. Res. Cardiol.* **95**, 13-22.

-
33. Wollert, K.C., Meyer GP., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A. y Drexler, H. (2004) *Lancet*. **364**, 141-148.
 34. Archundia, A., Aceves, J.L., López-Hernández, M., Alvarado, M., Rodríguez, E., Díaz, G., Páez, A., Masso, F., Montaña, L.F. (2005) *Life Sciences*. **78**, 279-283.
 35. Losordo, D.W., Schatz, R.A., White, C.J., Udelson, J.E., Veereshwarayya, V., Durgin, M., Poh, K.K., Weinstein, R., Kearney, M., Chaudhry, M., Burg, A., Eaton, L., Heyd, L., Thorne, T., Shturman, L., Hoffmeister, P., Story, K., Zak, V., Dowling, D., Traverse, J.H., Olson, R.E., Flanagan, J., Sodano, D., Murayama, T., Kawamoto, A., Kusano, K.F., Wollins, J., Welt, F., Shah, P., Soukas, P., Asahara, T. y Henry, T.D. (2007) *Circulation*. **115**, 3165-3172.
 36. Klein, H.M., Ghodsizad, A., Marktanner, R., Poll, L., Voelkel, T., Mohammad Hasani, M.R., Piechaczek, C., Feifel, N., Stocksclaeder, M., Burchardt, E.R., Kar, B.J., Gregoric, I. y Gams, E. (2007) *Circulation*. **114** (1Suppl), I145-I151.
 37. Engelmann, M.G., Theiss, H.D., Hennig-Theiss, C., Huber, A., Wintersperger, B.J., Werle-Ruedinger, A.E., Schoenberg, S.O., Steinbeck, G. y Franz, W.M. (2006) *J. Am. Coll. Cardiol.* **48**, 1712-1721.
 38. Choi, J.H., Choi, J., Lee, W.S., Rhee, I., Lee, S.C., Gwon, H.C., Lee, S.H., Choe, Y.H., Kim, D.W., Suh, W., Kim, D.K. y Jeon, E.S.. (2007) *Circ. J.* **71**, 486-494.
 39. Kang, H.J., Lee, H.Y., Na, S.H., Chang, S.A., Park, K.W., Kim, H.K., Kim, S.Y., Chang, H.J., Lee, W., Kang, W.J., Koo, B.K., Kim, Y.J., Lee, D.S., Sohn, D.W., Han, K.S., Oh, B.H., Park, Y.B. y Kim, H.S. (2006) *Circulation*. **114** (1 Suppl), I145-I151.
 40. Zohlnhöfer, D., Kastrati, A. y Schömig, A. (2007) *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **4** (Suppl 1), S106-S109.
 41. Clifford, D.M., Fisher, S.A., Brunskill, S.J., Doree, C., Mathur, A., Watt, S. y Martin-Rendon, E. (2012) *Cochrane Database Syst. Rev.* **15**, 2:CD006536.
 42. Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P., Finato, N., Beltrami, C. A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A. y Anversa, P. (2002) *N. Engl. J. Med.* **346**, 5-15.
 43. Johnston, P.V., Sasano, T., Mills, K., Evers, R., Lee, S.T., Smith, R.R., Lardo, A.C., Lai, S., Steenbergen, C., Gerstenblith, G., Lange, R. y Marbán, E. (2009) *Circulation*. **120**, 1075-1083.
 44. Lee, S.T., White, A.J., Matsushita, S., Malliaras, K., Steenbergen, C., Zhang, Y., Li, T.S., Terrovitis, J., Yee, K., Simsir, S., Makkar, R. y Marbán, E. (2011) *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**, 455-465.
 45. Makkar, R.R., Smith, R.R., Cheng, K., Malliaras, K., Thomson, L.E., Berman, D., Czer, L.S., Marbán, L., Mendizabal, A., Johnston, P.V., Russell, S.D., Schuleri, K.H., Lardo, A.C., Gerstenblith, G. y Marbán, E. (2012) *Lancet*. **379**(9819), 895-904.
 46. Nygren, J.M., Jovinge, S., Breitbach, M., Säwén, P., Röhl, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B.K. y Jacobsen, S.E. (2004) *Nat. Med.* **10**, 494-501.
 47. Charwat, S., Gyöngyösi, M., Lang, I., Graf, S., Beran, G., Hemetsberger, R., Nyolczas, N., Sochor, H. y Glogar, D. (2008) *Exp. Hematol.* **36**, 672-680.
 48. Nadal-Ginard, B., Torella, D. y Ellison, G. (2006) *Rev. Esp. Cardiol.* **59**, 1175-1189.

SEMBLANZA DEL DR. FELIPE MASSÓ ROJAS



Cargo actual: Jefe del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología "IGNACIO CHAVEZ".

Es egresado de la Facultad de Medicina, U.N.A.M. Cursó la Maestría y Doctorado en Investigación Biomédica Básica en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. Es Profesor de asignatura "A" en la materia de Inmunología a nivel licenciatura Facultad de Medicina U.N.A.M. de 1992 a la fecha.

Profesor en 12 cursos de Especialidad y/o Postgrado. Ha participado en un total de 63 artículos publicados en revistas, 18 nacionales y 45 internacionales y 4 capítulos de libros, además de 8 memorias de congresos *in extenso*, con mas de 350 citas a sus trabajos. Ha participado en un total de 129 trabajos presentados en diferentes congresos; 43 de ellos internacionales.

Ha participado como director o codirector de tesis en un total de 13 trabajos concluidos: 4 de Especialidad, 3 de Licenciatura, 2 de Maestría y 4 de Doctorado. Actualmente dirige una tesis de Doctorado. Además ha dirigido 5 trabajos de Servicio Social en Investigación en Medicina.

RECONOCIMIENTOS ACADEMICOS:

Miembro del S.N.I. desde 1991 a la fecha, de manera ininterrumpida; miembro del comité evaluador de exámenes profesionales Facultad de Medicina U.N.A.M. de 1995 a la fecha. 3er lugar al mejor trabajo libre en el XVI Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica. Aguascalientes, Aguascalientes México 1997; 5o lugar en el Premio Nacional de Investigación Odontológica de la Fundación Glaxo Wellcome Cd.de México, México 2000; 3er lugar en el II Congreso Nacional de Aterosclerosis auspiciado por la Asociación Mexicana para la prevención de la Aterosclerosis y sus Complicaciones (AMPAC) Guadalajara, Jalisco México 2003. 1er lugar 1er concurso del Instituto Científico Pfizer 2004. México 2004. 1er lugar XLV Congreso Anual Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología A.C. Querétaro, Querétaro, México 8 de mayo 2005. 1er lugar XXIV Coloquio de Investigación FES Iztacala UNAM.FES Iztacala Edo. de México. 2005.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVI, 65 – 81**, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

LA MITOCONDRIA EN EL CENTRO DEL UNIVERSO CELULAR

THE MITOCHONDRIA IN THE CELLULAR UNIVERSE CENTER

Marietta tuena de Gómez-Poyou y Concepción José-Nuñez

Departamento de Bioquímica y Biología Estructura, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Ciudad Universitaria, CP 04510, México, DF.
mtuena@ifc.unam.mx

Resumen.

Inicialmente las mitocondrias se estudiaron en funciones relacionadas con la bioenergética como la fosforilación oxidativa, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la β -oxidación y la oxidación de ciertos aminoácidos. En 1960 se describió que contenía DNA y que había enfermedades relacionadas con mutaciones de éste; además se aceptó que su origen era por endosimbiosis. Posteriormente se descubrió su importante papel en la muerte celular por apoptosis y la mitofagia. Sus funciones en localizaciones fuera de la mitocondria abrieron un nuevo y excitante campo de investigación.

Su relación con la regulación de la maquinaria epigenética y la expresión génica y su efecto primario sobre procesos patológicos como el envejecimiento y el cáncer ocupan ahora una parte muy importante de los trabajos de investigación sobre las mitocondrias.

Abstract

The initial studies of mitochondria dealt with functions related to bioenergetic processes, such as oxidative phosphorylation, operation of the tricarboxylic acid cycle, β oxidation of fatty acids and amino acid oxidation. In 1960, it was discovered that

mitochondria have ADN and that there are diseases related to alterations of this ADN. It was also proposed that mitochondria arose from endosymbiotic events. In later years it was found that mitochondria play important roles in apoptosis and mitophagy. The functions of mitochondria on events that occur on the outside of mitochondria has opened a new and exciting field of research.

The relation of mitochondria with the epigenetic machinery, genetic expression and its participation on aging processes and some pathological process, such as cancer, is now an active field of research.

Introducción.

La mitocondria es un organelo que controla los destinos de las células mas allá de la síntesis del ATP. Distribuye la energía y el poder reductor e integra los caminos metabólicos. Regula la maquinaria epigenética, la expresión génica, los factores de transcripción y las vías de señalización.

La mitocondria es una planta de energía autoregurable. Actúa como un centro de recepción de señales finas del universo celular y responde a las necesidades metabólicas de todos los componentes de la célula de una manera integrada y eficiente.

En este trabajo se intenta revisar las múltiples funciones que realiza la mitocondria que se han ido descubriendo a medida que las investigaciones han progresado, demostrando su gran capacidad de integración de todas las funciones vitales de la célula normal y en numerosas condiciones patológicas.

El origen de las mitocondrias. El big-bang evolutivo.

La teoría de la endosimbiosis implica la fusión de una arqueobacteria anaeróbica o protoeucarionte, el huésped, con una α -proteobacteria capaz de respirar, el simbiote. Este hecho representó el big-bang en la evolución de los eucariotes. Durante este evento hubo desaparición de genes redundantes en el simbiote y su transferencia al huésped. El simbiote, ancestro de las mitocondrias, es un procarionte que perdió su libertad, pero ganó muchas cosas a cambio. Se ahorró la energía de producir el 90% de sus proteínas que son codificadas en el núcleo por el DNA nuclear, traducidas en los polirribosomas citoplásmicos e introducidas a las mitocondrias por sistemas de transporte activo y acarreadores específicos, su entrada a la mitocondria es seleccionada a través de un péptido señal, que es procesado por proteasas específicas y ya maduro es insertado en los diferentes compartimentos y membranas del organelo, su transporte depende de ATP y del potencial de membrana.

En resumen, la mitocondria experimentó una evolución reductiva de su genoma ancestral que dio como resultado un microgenoma, mantenido por el proteoma del eucarionte huésped.

La integración de los genes del simbiote al núcleo, fue paulatino y sigue existiendo aún en especies actuales. A esto se debe que los genes nucleares que codifican a las proteínas mitocondriales se encuentren con frecuencia repartidos en el genoma nuclear y no formando operones.

Las mitocondrias en el centro del Universo celular.

Origen de las mitocondrias: big-bang evolutivo: simbiosis de alfa-proteobacteria aeróbica con protoeucariote anaeróbico.

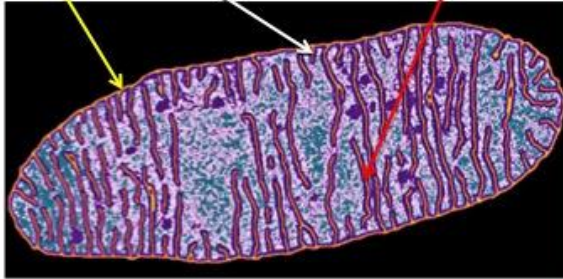
Genoma mitocondrial, cromosoma 24. Reloj molecular. Genética de poblaciones.

Compartimentos acuosos: intermembranal, intracrestal y matriz

M. externa

M. interna

Crestas tubulares



Funciones canónicas:

fosforilación oxidativa

Ciclo de Krebs

Beta oxidación

Ciclo de la urea

Regulación de: la poza de nucleótidos y de segundos mensajeros AMPc y Ca²⁺.

Regulación del poder reductor: NAD:NADP/NADH:NADPH.

Síntesis de esteroides y de grupo Hemo.

Muerte celular por apoptosis. Mitofagia y autofagia.

Poro de transición de la permeabilidad (PTP)

Formación de ROS

Dinámica mitocondrial:

• Composición:

Lípidos: colesterol, cardiolipina y fosfolípidos.

Proteínas: Respirosoma y ATP sintasoma

• Formación de redes por fisión, fusión .

Heteroplasmia → Homoplasmia.

• Estados 4 y 3 estructuras ortodoxa y condensada.

Proteínas moonlight. Complejos y subunidades aisladas.

Reguladores del epigenoma :

ATP, NAD, Acetil-CoA y S-adenosil metionina (SAM) mitocondrial, "código de las histonas".

Papel de la mitocondria en procesos patológicos:

Envejecimiento una enfermedad causada por disfunción mitocondrial.

Cáncer una enfermedad metabólica ,previsible de origen mitocondrial.

Cambios metabólicos como factor común.

Prevención y tratamiento.

El evento de fusión del simbiote solo ocurrió una vez en la evolución, el proceso se denomina monofilético. Las células de eucariontes que carecen de mitocondrias, las perdieron en el curso de la evolución. En la naturaleza existen ejemplos: los mitosomas y los hidrogenosomas que evolucionaron a partir de las mitocondrias.

Dinámica mitocondrial.

Estructuralmente, las mitocondrias están formadas por dos envolturas membranales: la membrana externa y la interna. La composición de lípidos y proteínas es diferente para cada una de ellas. Las dos membranas limitan tres espacios acuosos: el intermembranal, el intracrestal y la matriz mitocondrial.

La membrana externa contiene, entre otras proteínas, una permeasa característica, la porina ó canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) que permite la entrada y salida de proteínas y solutos. Durante la muerte celular por apoptosis y en condiciones de estrés oxidativo se asocia a la translocasa de ADP-ATP y a un acarreador de calcio formando el poro de transición de permeabilidad (PTP) produciéndose una salida masiva de proteínas, depolarización de la membrana y la muerte celular.

La membrana interna contiene proteínas especializadas para el transporte de electrones: el complejo I (NADH /ubiquinona óxidorreductasa), el complejo II (succinato /ubiquinona óxidorreductasa), el complejo III ó bc1 (ubiquinol/citocromo c óxidorreductas) y el complejo IV (citocromo c oxidasa). Todos ellos se asocian entre sí formando supercomplejos llamados respirosomas.

Las proteínas asociadas al complejo V ó (ATP sintasa) del complejo de la fosforilación (F_1F_0) se asocian a los acarreadores de ADP/ATP y de fosfato formando una unidad: el ATP sintasoma. El complejo V se oligomeriza formando dímeros y oligómeros de éstos (tetrámeros, hexámeros, etc.) que estructuran las crestas tubulares, de preferencia en las puntas de éstas.

Las crestas tubulares están unidas a la membrana interna por una zona estrecha o pié de cresta. Dentro de las crestas tubulares la distribución de proteínas es variable y dinámica. En su interior se compartimentaliza el ADP y los H^+ .

Por otro lado, se ha estudiado la funcionalidad de los oligómeros del complejo V y si éste actúa como monómero u oligómero durante su función catalítica. Se han encontrado proteínas que oligomerizan y que residen en el segmento hidrofóbico de la enzima, por ejemplo: las subunidades “e” y “g” y una proteína localizada en el pié de la cresta: la mitofilina que monomeriza el complejo V [1]. Esto parece sugerir que la dinámica de conversión de oligómeros a monómeros puede influir en la funcionalidad de la enzima. Esta membrana tiene un alto contenido de cardiolipina y bajo en colesterol. La membrana interna tiene la mayor proporción de proteínas/lípido que cualquier otra membrana de la célula: 2.85 en la interna y 1.66 en la membrana externa. Con 75% de proteína y 25% de lípidos. Se ha calculado que la superficie membranal que ocupan las crestas tubulares en una mitocondria de corazón es de 250 metros cuadrados por gramo de proteínas mitocondriales.

Los compartimentos acuosos entre las membranas interna y externa: el espacio intermembranal, contiene proteínas acarreadoras de sustratos entre otras, el intracrestal, que es el espacio interior de las crestas tubulares, complejos acarreadores de proteínas y sustratos como el ADP y el fosfato que se requieren para la función de síntesis de ATP. La matriz, que es el espacio limitado por los pliegues de las crestas, muestra cambios drásticos de volumen durante los estados funcionales de la mitocondria. En el estado 4, en presencia de fosfato y sustratos oxidables (malato, succinato, piruvato, etc.) con la cadena funcionando y el potencial de membrana al máximo, la mitocondria expande la matriz mitocondrial y reduce el espacio intracrestal, a este macroestado estructural se le conoce como una conformación ortodoxa [2], si se añade ADP se obtiene una aceleración del consumo de oxígeno y un descenso en el potencial de membrana que se utiliza para sintetizar el ATP. A este estado se le denomina estado 3 y se acompaña de un macroestado estructural conocido como condensado, la matriz mitocondrial se contrae y el espacio intracrestal se expande permitiendo el libre flujo de sustratos para obtener la máxima capacidad de síntesis del ATP. Esta compartimentalización y especialización del contenido de proteínas de las

membranas permite que la mitocondria lleve a cabo con gran eficiencia sus numerosas funciones.

Formación de redes por fusión y fisión.

Las mitocondrias pueden interaccionar entre ellas formando redes dinámicas: por fusión, división y tubulación. Una posible función de estos eventos es la homogenización del material genético heteroplásmico heredado después de la fecundación a uno homoplásmico con material genético menos heterogéneo o completamente homogéneo. Además, puede funcionar como una medida de protección del DNA mitocondrial contra el daño oxidativo y durante la muerte celular por apoptosis. También se ha supuesto que contribuye a seleccionar nuevas funciones que sean evolutivamente más favorables y a desaparecer otras que resulten obsoletas.

La tubulación, que es la formación de las crestas tubulares para obtener la máxima eficiencia catalítica del complejo V, está ligada a la distribución de los nucleoides mitocondriales [3] y se ha asociado a la importación de las proteínas codificadas por el DNA nuclear. Es la forma funcional de las crestas mitocondriales que proporcionan mayor superficie membranal dentro del volumen mitocondrial. Mediante estos continuos cambios se forma un retículo dentro de la célula moviéndose adosadas al citoesqueleto, por los microtúbulos lo que les permite distribuirse dentro de la célula haciendo más eficiente la utilización del gradiente de H^+ y manteniendo la homeostasis del calcio.

Las mitocondrias presentan distintas morfologías dependiendo de la estirpe celular a la que pertenezcan. Su número de mitocondrias varía por célula dependiendo de los requerimientos de energía de la misma célula, siendo los tejidos más ricos en mitocondrias el músculo cardíaco, el músculo esquelético y el cerebro. La permeabilidad de la membrana interna es limitada y muy selectiva, por lo que se requieren de sistemas especializados de transporte de sustratos, iones y para la continua y activa importación de proteínas.

Actúan como osmómetros, se hinchan expandiendo el espacio de la matriz, con la consecuente contracción del espacio intracrestal, y se contraen reduciendo el espacio de la matriz y expandiendo los espacios intracrestales. En los hepatocitos las mitocondrias presentan una especialización funcional, son más glicolíticas cuando están rodeando los espacios periportales y más oxidativas las que rodean a la arteria hepática. Por otro lado, durante el ciclo celular, las perinucleares tienen un potencial membranal menor que las adosadas a la membrana plasmática.

Las membranas de las mitocondrias establecen una comunicación estrecha con las membranas de otros organelos, que junto con el retículo sarcoplásmico regulan las pozas de calcio intracelulares e intercambio de lípidos con las membranas del aparato de Golgi.

Proteínas moonlight del complejo V en condiciones normales y patológicas.

Existen proteínas, cuyos ejemplos han aumentado notablemente, que se originan de un mismo gene pero que en la célula pueden desempeñar distintas funciones, estas proteínas se conocen como “moonlighting” a semejanza de los trabajadores que desempeñan distintos trabajos durante el día y la noche. Muestran el ingenio de que es capaz la naturaleza, porque diversifican las funciones de las proteínas sin expandir el genoma, son un motor de la evolución para desarrollar nuevas funciones utilizando las viejas estructuras [4].

Son la consecuencia de una interacción entre las proteínas vecinas que se encuentran muy concentradas en los distintos compartimentos celulares. Mostrando que la célula moderna ha evolucionado a un sistema altamente sofisticado, organizado y con un nuevo nivel de complejidad, capaces de establecer relaciones entre vías metabólicas y caminos de regulación totalmente insospechadas.

La primera sospecha de su existencia fue la observación de que el genoma humano codifica para pocas proteínas y tiene que cumplir con las enormes funciones que requiere un organismo tan complejo. Una opción era pensar que sus proteínas pudieran realizar más de una función, sin relación con su función original, actuando de manera autónoma y utilizando los mismos dominios o subunidades de la proteína original, pero en sitios de la proteína fuera del sitio catalítico, que estuvieran expuestos al solvente, en nuevos sitios de fijación para nuevos ligandos o para otras proteínas.

Los mecanismos que emplean son múltiples, frecuentemente se localizan en diferentes compartimentos celulares, organelos o en diferentes membranas. Pueden ser expresados constitutivamente en diferentes cantidades dependiendo del compartimento celular. Generalmente son proteínas con estructuras complejas, oligoméricas y multifuncionales, formadas por diferentes subunidades y que han sido conservadas durante la evolución en toda la escala filogenética.

El segmento F_1F_0 de la H^+ ATP sintasa, cumple con creces las características requeridas para ser un candidato a “moonlighting”. Es un complejo proteico presente en casi todos los organismos, de gran complejidad estructural, compuesto, en los eucariotes, por cuando menos 16 subunidades, con estructuras que realizan dos funciones diferentes: el segmento F_0 , de naturaleza hidrofóbica, está embebido en la bicapa de la membrana interna mitocondrial y realiza la función eléctrica del complejo: transporta cargas positivas de la cara externa de la membrana interna a la matriz (H^+ ó Na^+) y el segmento F_1 , hidrofílico, es el componente catalítico de la enzima y sintetiza el ATP.

En el F_1 existen dos ejemplos de localización ectópica que han sido ampliamente estudiados: en la membrana plasmática de las células endoteliales se localizaron todas las subunidades del complejo F_1 : $\alpha_3/\beta_3/\gamma/\delta/\epsilon$ y la proteína reguladora de la catálisis, la IF_1 . Con estudios de proteómica se identificaron el resto de las subunidades de F_0 y se ha medido su capacidad para sintetizar ATP, que como se sabe es nula. Sin embargo, la enzima hidroliza ATP exógeno, ya que mira hacia el espacio extracelular. Su función principal es ser el receptor de la angiostatina, un inhibidor de la angiogénesis, que bloquea la hidrólisis de ATP del complejo [6]. Se ha supuesto que la llegada del complejo y su fusión a la cara externa de la membrana plasmática se hizo a través de las llamadas “balsas lipídicas resistentes a detergente”, que son complejos de lípido-

proteína que tienen la capacidad de fundirse a la membrana plasmática de las células endoteliales, probablemente a partir de la membrana interna mitocondrial. Sin embargo no hay datos sólidos experimentales que lo demuestren [5, 6].

El segundo ejemplo reportado fue la localización del complejo F_1 en la membrana plasmática del hepatocito, actuando como un receptor de la apolipoproteína A1 (Apo A1), que forma parte de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que protegen contra la aterosclerosis estimulando el transporte reverso del colesterol de las células periféricas al hígado, para su posterior metabolismo y su excreción. Se ha medido la hidrólisis de ATP y la generación de ADP de la que depende la fijación de la Apo A-1 [7].

El citocromo c, componente de la cadena transportadora de electrones, cumple con la función de “moonlight”, ya que además de transportar electrones del complejo III al complejo IV, puede ser liberado al citoplasma por la mitocondria a través del poro de transición de permeabilidad (PTP), formado en la membrana mitocondrial, siendo uno de los factores importantes en la cascada de las caspasas que dirige y dispara la muerte celular por apoptosis [8].

Existen varios ejemplos de subunidades de la F_1 con función moonlight en condiciones normales: la subunidad α del segmento F_1 puede actuar como chaperonina [9]. Además, forma parte del complejo de importación de un RNA de transferencia a la mitocondria. Finalmente se ha reportado su actividad como receptor de citosina, p43 factor en la inflamación [10].

Por otro lado, en el segmento F_1 la subunidad β se ha reportado como receptor de la hormona enterostatina [11]. En el segmento F_0 se ha descrito que la subunidad F_6 puede funcionar como un vasoconstrictor [12]. La subunidad c en la membrana del sinaptosoma interviene en la liberación de la acetilcolina.

Se ha descrito que la IF1 actúa como una proteína reguladora de la actividad del complejo F_1F_0 . Tomando como modelo a *Caenorhabditis elegans*, por las grandes similitudes con los eucariotes, se describió que la F_1 se sintetiza en compartimentos mitocondriales (Mai 2). Es sintetizada en los polirribosomas citoplásmicos con su péptido señal en el amino terminal que hace que sea transportada a la mitocondria y otro citoplásmico (Mai 1), con igual secuencia sin péptido señal [13]. Esta proteína moonlight se desconoce su función en el citoplasma.

En colaboración con el grupo de Dra. Rosa Navarro de nuestro Instituto, experta en *C. elegans*, hemos iniciado experimentos para dilucidar su función en distintas estirpes celulares utilizando RNA de interferencia para cada una de las proteínas y estudiando los respectivos fenotipos. Recientemente se publicó la existencia de la IF1 mitocondrial en el suero de humanos normales [14], por lo que quedan otras funciones que descubrir de ésta multifacética proteína.

Proteínas moonlight del complejo F_1F_0 en condiciones patológicas:

Se han descrito algunos ejemplos de componentes del complejo F_1F_0 que se pueden describir como moonlight en condiciones patológicas. Uno de estos ejemplos es la subunidad α ; que forma parte de los agregados en el cerebro de enfermos con Alzheimer [15]. La subunidad β , que se acumula en la membrana de los linfocitos citotóxicos implicados en la inducción de la destrucción de los tumores. La subunidad c en la enfermedad denominada lipofuscinosis ceroides, que afecta los canales de Na^+ y Ca^{2+} en los cardiocitos y las neuronas [16]. Con estos ejemplos el campo de las proteínas moonlight se ha enriquecido y nos ha mostrado que este tipo de observaciones no son tan infrecuentes como se pensaba.

El genoma mitocondrial ó el cromosoma 24.

El genoma mitocondrial ha sido extensamente estudiado, es de herencia materna, ya que en la formación del cigoto después de la fecundación, solo se heredan las mitocondrias del óvulo que contiene aproximadamente 100,000 copias del DNA y las de la cabeza del espermatozoide que aporta unas 100 copias de su DNA.

El DNA mitocondrial de humano es circular, de doble cadena, superenrollado, formado por 16,569 pares de bases. La cadena externa pesada y la interna ligera codifican para diferentes proteínas y la separación de los genes no es clara, se intercalan genes de proteínas con genes que codifican para RNAs de transferencia y existe con frecuencia sobrelapamiento de genes, que se traducen como un policistrón. Como no existe una secuencia que indique el sitio de iniciación, se han descrito proteínas que actúan como activadores de la traducción y ayudan a localizar el sitio de iniciación [17].

Hay diferencias claras entre el DNA nuclear y el DNA mitocondrial: el mitocondrial se duplica de manera autónoma independiente del nuclear, una vez por cada ciclo celular, carece de histonas y forma complejos llamados nucleoides con proteínas específicas relacionadas con la duplicación del DNA, su transcripción a RNA mensajero y su traducción a proteínas. Cada nucleoide se adosa a la membrana interna mitocondrial y contiene 6 copias de DNA. Los nucleoides son unidades dinámicas que responden a las condiciones metabólicas de la célula. Presentan una frecuencia de mutaciones de 7 a 10 veces mayor que el DNA nuclear y un sistema de reparación deficiente. La traducción de ambas cadenas pesada y ligera es bidireccional y asincrónica. Los codones para los aminoácidos difieren del código universal.

Durante la fecundación y la herencia de las mitocondrias del óvulo y del espermatozoide existe heterogeneidad en los genes que contiene cada mitocondria lo que se conoce como heteroplasmía a diferencia de la homoplasmía en que todas las copias del DNA son iguales, esto ocasiona que se hereden en forma no mendeliana. El genoma mitocondrial funciona como un “reloj molecular” en la evolución de las poblaciones humanas [18].

Como se duplica y muta a mayor velocidad que el DNA nuclear funciona como un reloj molecular y ha sido utilizado para estudios de evolución reciente. Utilizando secuencias del DNA de humanos llamadas polimórficas, en las que se encuentran variaciones silenciosas o neutras y estudiando distintas poblaciones se encontró una

correlación entre el número de nucleótidos cambiados en el genoma y el tiempo transcurrido.

Comparando las mismas secuencias del DNA en organismos de las mismas o de diferentes especies, a través de sus polimorfismos, se forman los haplotipos o grupos que se heredan de una generación a otra y que han servido como marcadores genéticos que caracterizan las diferentes poblaciones humanas, y han servido para formar grupos por su origen étnico o por su ubicación geográfica. Estos estudios identificaron a la primera "Eva", que vivió hace 200 000 años en África, como la madre de la especie humana. Estas secuencias polimórficas permitieron seguir el rastro de la migración humana a todos los continentes que fue el resultado de oleadas migratorias múltiples. En las poblaciones de los amerindios hay los que provienen de origen materno asiático o los que provienen de las migraciones siberianas. Con esta metodología fue posible concluir que el Homo sapiens se originó en África hace aproximadamente 130 000 años, que emigró a Asia hace 70 000 años, y que 12 000 años después colonizó Europa y el Oriente Medio. Posteriormente debido a tres oleadas migratorias diferentes a los 34 000, 15 000 y 9 500 años, colonizó el centro, sur y norte de América. Siendo los esquimales los más recientes que emigraron de Asia hace 3 000 años y poblaron Alaska [18].

Sistemas de traducción e inserción de las proteínas codificadas por el DNA mitocondrial.

El DNA mitocondrial humano codifica para 13 proteínas: 6 del complejo I de la cadena respiratoria o NADH deshidrogenasa, el citocromo b del complejo III ó ubiquinol citocromo "c" óxidorreductasa, las 4 subunidades de la citocromo oxidasa y dos subunidades de la ATP sintasa. Además, codifica para dos especies de RNA ribosomal, 16S y 12S y para 22 RNAs de transferencia. La traducción de las proteínas codificadas por el DNA mitocondrial está diseñada para subunidades hidrofóbicas, con numerosos cruces transmembranales. Por lo que su traducción está coordinada a su inserción membranar, por lo que depende del potencial transmembranar y de ATP [17].

No existe recombinación, lo que garantiza la fidelidad de la traducción de proteínas que son vitales para el funcionamiento correcto de la cadena de transporte de electrones y la síntesis del ATP. Todos los factores de transcripción son de origen nuclear. Los sitios de iniciación de la traducción no tienen la secuencia señal del extremo 5 prima no traducido y para comenzar la traducción se requieren activadores de la traducción que localizan el sitio de iniciación.

Acoplada a la traducción en los mitorribosomas se inicia la inserción a la membrana coordinada por chaperonas. Existen factores de elongación y codones de paro, pero es en la maquinaria de traducción en la que con frecuencia se observan mutaciones que son las causas más frecuentes de las enfermedades clasificadas como de origen mitocondrial.

El 90% de las proteínas mitocondriales es codificado por el DNA nuclear traducidas en los ribosomas citoplásmicos como preproteínas, con un péptido señal que las dirige a los diferentes compartimentos mitocondriales: membrana externa,

espacio intermembranal, membrana interna, espacio intracrestal, pié de crestas y matriz mitocondrial. Utilizando sistemas específicos de transporte codificados por el DNA nuclear. Las proteínas son translocadas y desenrolladas con chaperonas asociadas; su maduración se lleva a cabo por proteasas que cortan el péptido señal y permiten su inserción coordinada con el resto de las proteínas codificadas por ambos DNAs, el nuclear y el mitocondrial ya que la mayoría de los complejos es de origen bigenómico.

Las mitocondrias realizan una gran variedad de funciones que responden a todas las necesidades de la célula; esto se debe a que mantienen un alto grado de organización y tienen una gran complejidad estructural. Es capaz de extraer y procesar la energía de los nutrientes y sintetizar su propio acarreador de energía: el ATP que es universalmente utilizado para realizar trabajo.

Funciones canónicas:

Fosforilación oxidativa y síntesis de ATP.

Sobre este tema las investigaciones han mostrado enormes progresos:

1. La síntesis de ATP en el complejo F₁F₀ es el resultado de la función acoplada de dos rotores uno de componente eléctrico que conduce iones positivos, H⁺ o Na⁺, estructuralmente representado por un carrusel de 8 a 15 subunidades "c" al que se adosa la subunidad "a" que es el conductor de los H⁺ a través de la formación de dos hemicanales de entrada o de salida de los iones. El segundo componente coordina la función química de la síntesis o hidrólisis del ATP en los 3 sitios catalíticos de un hexámero compuesto por 3 heterodímeros de las subunidades α/β en el centro del cual gira el segundo rotor compuesto por las subunidades γ, δ, ϵ en la enzima de los Eucariotes. Existen además subunidades que son estabilizadores del complejo durante la rotación y que forman la parte periférica o "cuello lateral" formado por los componentes estructurales OSCP, subunidad "b", subunidad "d" y subunidad "a"(F₆). Funcionalmente la enzima se ha dividido en rotor: compuesta por las subunidades: c, γ, δ y ϵ . Estator: compuesto por los 3 dímeros α/β mas las subunidades del cuello lateral. El sector membranal se ha visto enriquecido con nuevas subunidades: e, f, g, h, i, j y k., cuya función específica comienza a ser descubierta. Las subunidades e y g están implicadas en la oligomerización del complejo F₁F₀ y en la remodelación de las crestas tubulares.

Su regulación por una proteína supernumeraria descrita inicialmente como un inhibidor de la hidrólisis (IF1). Ha continuado activamente en diferentes grupos de investigación y conocemos su estructura en solución y en el complejo F₁-IF1, utilizando una preparación de F₁ reconstituída con un exceso de IF1 exógena [19], que funcionalmente difiere de la endógena [20] por lo que su función y su interacción con la enzima sigue siendo motivo de investigación.

Es una proteína de 84 aminoácidos que presenta diferentes dominios de interacción con la enzima: en el extremo amino terminal los residuos del 1 al 22 actúan como un estabilizador del complejo [22]; el segmento comprendido entre los aminoácidos 23 al 45 contiene los elementos que producen la inhibición, interaccionando con la interfase α/β y con la subunidad γ , interrumpiendo la interacción de un segmento elástico del carboxilo terminal de la subunidad β (DELSEED) con la

subunidad γ que funcionalmente parece ser el sitio para detener la rotación del complejo $\gamma/\delta/\epsilon$ e inhibir la catálisis reversiblemente en ambos sentidos de la reacción [21].

Los residuos del carboxilo terminal 46-52 forman una bisagra [23] que separa el segmento intra F_1 con el exterior de la enzima que contiene los residuos 53-84, que con otro complejo IF_1-F_1 forma una estructura de hélices superenrolladas y dimeriza a la enzima, que se supone es la unidad oligomerizante del complejo: dímeros, tetrameros, hexámeros, etc. En la forma monomérica el complejo IF_1-F_1 y por la flexibilidad que le confiere la bisagra, el carboxilo terminal de la IF_1 puede interactuar con las subunidades del cuello lateral como la OSCP [24].

Nuestro grupo de trabajo continúa activamente investigando estas nuevas facetas de la proteína reguladora en su forma endógena. En colaboración con las Dras. Adela Rodríguez y Alejandra Hernández, cristalógrafas del Instituto de Química, se han obtenido cristales del complejo IF_1-F_1 con la proteína reguladora endógena, los resultados muestran diferencias en la ubicación de la proteína con respecto al reconstituido.

2. La correlación estructura-función de este extraordinario complejo protéico cuya eficiencia cercana al 100%, supera el de otros motores procesivos como en la actina-miosina. El secreto de su alta eficiencia es que posee en su compleja estructura zonas elásticas que almacenan la energía y son capaces de transmitirla a los sitios catalíticos. La energía o torca de rotación del rotor central aplicado a la subunidad γ por el componente eléctrico, representado por el gradiente de H^+ , se transmite a distancia a los sitios catalíticos en las 3 interfases α - β asimétricas por su diferente contenido de nucleótidos; un sitio vacío, un sitio con ADP y un sitio con ATP. Los contactos entre la subunidad gamma del rotor y la parte elástica de las subunidades catalíticas, permite la reversibilidad del complejo en la síntesis consumiendo el gradiente eléctrico o generándolo durante la hidrólisis.
3. La gran versatilidad cinética y estructural de este complejo, sigue siendo material de investigación y una nueva explicación de cómo funciona es compararla con la transformación que han sufrido las computadoras de analógicas a digitales señalando que actúa como un transformador analógico-digital de energía que integra señales analógicas: el gradiente eléctrico del H^+ , con otras formas de energía: mecánica, elástica y magnética generadas por la rotación, dando como resultado una señal digital representada por la estequiometría H^+ -ATP sintetizado [25].

Regulación mitocondrial del epigenoma.

El epigenoma es la información heredable durante la división celular, a través del “código de las histonas”, además de la herencia por el DNA. En el epigenoma, las histonas se modifican postraduccionalmente, remodelan la cromatina y regulan la expresión de los genes [27, 28].

El DNA nuclear está empacado formando nucleosomas, esta protegido por un conjunto de diferentes histonas H2A, H2B, H3 y H4. En los nucleosomas los genes se organizan en territorios estructurales y funcionales que forman fábricas de transcripción que facilita la expresión de genes que se encuentran repartidos en diferentes cromosomas, como sucede con los genes de las proteínas mitocondriales que se encuentran dispersos en diferentes cromosomas, resultado de su incorporación paulatina al genoma nuclear. Las regiones inactivas durante la transcripción se localizan en zonas LOCKS.

Un componente muy importante de la maquinaria epigenética son las diferentes histonas asociadas a la cromatina, que reciben señales del medio externo a través de los sustratos generados en las mitocondrias y exportados al núcleo, en el que las enzimas nucleares las modifican covalentemente dando como resultado la apertura o el cierre de la expresión de los genes y estableciendo vías específicas de traducción que son heredables, se perpetúan durante la división celular en la fase posterior a la mitosis y establecen cambios fenotípicos sin variaciones genéticas.

Existen diferentes sustratos provistos por la mitocondria que son utilizados para modificar el código heredable de las histonas nucleares que remodelan la cromatina e inducen la expresión de los genes.

ATP. EL ATP es el sustrato de las fosforilasas de las histonas, que al introducir un grupo cargado negativamente tienden a abrir la cromatina y reposicionar los nucleosomas a través de activadores y silenciadores. Por otra parte, a través de reacciones dependientes de ATP la maquinaria epigenética actúa directamente sobre proteínas efectoras de diferentes vías de señalización y factores de transcripción.

Acetil CoA. Las histonas son acetiladas por acetilasas específicas (HATs) que requieren Acetil-CoA como sustrato, actúan añadiendo un grupo acetilo a las lisinas que disminuye su carga positiva abren la expresión de los genes y estimulan la transcripción y secundariamente a los factores de transcripción y vías de señalización.

NAD. Las histonas nucleares son desacetiladas por desacetilasas específicas llamadas sirtuínas que utilizan como coenzima al NAD proporcionada por la mitocondria a través de la exportación del poder reductor.

Ambas la Acetil-CoA y el NAD son proporcionadas por la mitocondria formando parte de la llamada “respuesta retrógrada” (RT) de la mitocondria al núcleo.

S-adenosil –metionina (SAM). La S-adenosil metionina se produce en el citoplasma a partir de L-metionina y ATP dando como productos SAM+pirofosfato y fosfato. La producción de metionina a partir de homocisteína es producto de enzimas mitocondriales. Por lo que la producción de ambos sustratos depende de la función mitocondrial.

Las metilaciones de las histonas que dependen de SAM aumentan las fuerzas de Van der Waals resultando en cambios en la metilación de las citocinas en el DNA y de las lisinas y argininas de las histonas. Estas modificaciones resultan más versátiles que las fosforilaciones o las acetilaciones, su efecto sobre la expresión de los genes es aumentar la interacción y cerrar la cromatina.

Estas modificaciones de las histonas son más frecuentes en las células proliferantes inmortales, como las células germinales, las células “madre” (stem) y las células neoplásicas que tienen la cromatina abierta a diferencia de las células somáticas especializadas y no proliferantes que tienen la cromatina cerrada. (LOCK). Son dependientes del buen funcionamiento mitocondrial y en conjunto, forman parte de la respuesta retrógrada (RT) mitocondrial al núcleo. Regulando el ciclo celular, la diferenciación y la plasticidad celular. Existen otras modificaciones de las histonas como ubiquitinación, sumoylación y desamidación de las argininas en las histonas. Todas estas modificaciones postraduccionales constituyen el “Código de las histonas” que es heredable y modifica la expresión de los genes.

En conclusión la expresión coordinada de genes nucleares de proteínas mitocondriales depende de los requerimientos de energía del DNA nuclear y su regulación transcripcional por enzimas y sustratos (ATP, NAD, AcetilCoA y Sadenosil metionina) generados directa o indirectamente por las mitocondrias que establecen una cooperación energética/epigenética que es un proceso dinámico que responde a las variaciones del medio y en las cuales la mitocondria es el intermediario para las modificaciones posteriores del epigenoma y su respuesta. (27)

Papel de las mitocondrias en diferentes condiciones patológicas.

Envejecimiento es una enfermedad degenerativa, irreversible de origen mitocondrial causada por estrés oxidativo y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los sitios I y III de la cadena, con acumulación progresiva de mutaciones del DNA mitocondrial y posteriormente productos de oxidación en proteínas, lípidos estructurales, carbohidratos y al DNA nuclear. Este es el mecanismo que parece ser el más aceptado hasta ahora [29, 30].

La protección de las funciones mitocondriales con antioxidantes no ha modificado sensiblemente la máxima vida media de ninguna especie que está genéticamente determinada, con el fin de mantener los miembros de una especie hasta la edad reproductiva y garantizar la sobrevivencia de la especie. Sin embargo, los cambios degenerativos inevitablemente progresivos del envejecimiento pueden ser paliados disminuyendo la producción de especies reactivas de oxígeno; por ejemplo por restricción calórica y previniendo las enfermedades asociadas a este proceso como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

Cáncer: una enfermedad metabólica previsible originada por disfunción mitocondrial [31].

Existen en la actualidad numerosos estudios en modelos animales que parecen afirmar la idea de que es la disfunción mitocondrial la causa primaria de las alteraciones que ocurren en todos los tejidos neoplásicos, y que la inestabilidad genética es secundaria a los cambios metabólicos primarios de la disfunción mitocondrial.

Etapas metastáticas. Producción de metástasis: se ha observado que la dediferenciación de las células de tumores metastáticas presentan un fenotipo

semejante a los macrófagos o a las células mesenquimatosas que les permite emigrar a través de los vasos sanguíneos y hacer siembras a distancia.

Prevención: Los principios de prevención requieren un cambio de estilo de vida que parece necesario para prevenir el cáncer y muchas otras enfermedades degenerativas que predisponen a su aparición.

Evitar los cancerígenos que dañan la fosforilación oxidativa, como los procesos inflamatorios crónicos, las radiaciones, los cancerígenos ambientales, la hipoxia, las infecciones virales, el uso del tabaco, el abuso del alcohol y la obesidad. Prevenir la formación excesiva de ROS con antioxidantes, como el glutatión y polifenoles. Mantener una dieta de restricción calórica sana y una actividad física moderada.

Tratamiento: Un tratamiento barato, efectivo y menos traumático que los utilizados en la actualidad consiste en mantener una dieta balanceada de restricción calórica periódica, bajando el consumo de glucosa que estimula la glicólisis aeróbica y la sobrevida del tumor. Adicionar en la dieta ácidos grasos omega 3 para dar un “golpe metabólico” a las células indiferenciadas. Adicionar inhibidores de la glicólisis como la 2-deoxiglucosa o factores que mejoren la carga energética, como la adenosina de vida media larga que ha sido utilizada como un hepatoprotector, que previene el deterioro mitocondrial [34].

En colaboración con Dra. Victoria Chagoya, se ha estudiado en modelos animales el efecto de la adenosina como hepatoprotector del daño mitocondrial en la cirrosis hepática y en la prevención y reversión de la producción de cáncer hepatocelular experimental en ratas.

En nuestro laboratorio hemos estandarizado una técnica rápida de extracción del los complejos de F_1F_0 , por un detergente, la digitonina, su separación en geles nativos y su capacidad de hidrolizar ATP por una técnica de tinción en el gel. Estas técnicas han sido ampliamente empleadas para determinar actividades de enzimas en células aisladas o en tejidos y obtener datos semiquantitativos por densitometría con un grado de incertidumbre aceptado de un 20%. Resultados preliminares de nuestro laboratorio, utilizando estas técnicas a partir de mitocondrias de hígado de rata de los tres grupos experimentales estudiados y caracterizados en el laboratorio de la Dra. Chagoya evaluamos el contenido de enzimas F_1F_0 activas en: controles, cancerígeno por 18 semanas y en un programa de prevención consistente en la administración simultánea del cancerígeno y un derivado de la adenosina (IFC 305) por las mismas 18 semanas. Las muestra además fueron evaluadas por otros métodos para medir el grado de malignización del DEN y su reversión por el derivado de la adenosina. Los resultados sugieren que es posible utilizar la técnica para evaluar el grado de daño mitocondrial por el cancerígeno y su prevención por el tratamiento con el derivado de la adenosina, midiendo el % de enzimas activas en los geles nativos. El aceptar que el origen de las neoplasias es una enfermedad metabólica producida por una disfunción primaria de las mitocondrias, es un concepto revolucionario que cambia totalmente los actuales procedimientos de tratamiento y abre la puerta a medidas de prevención no contempladas con anterioridad.

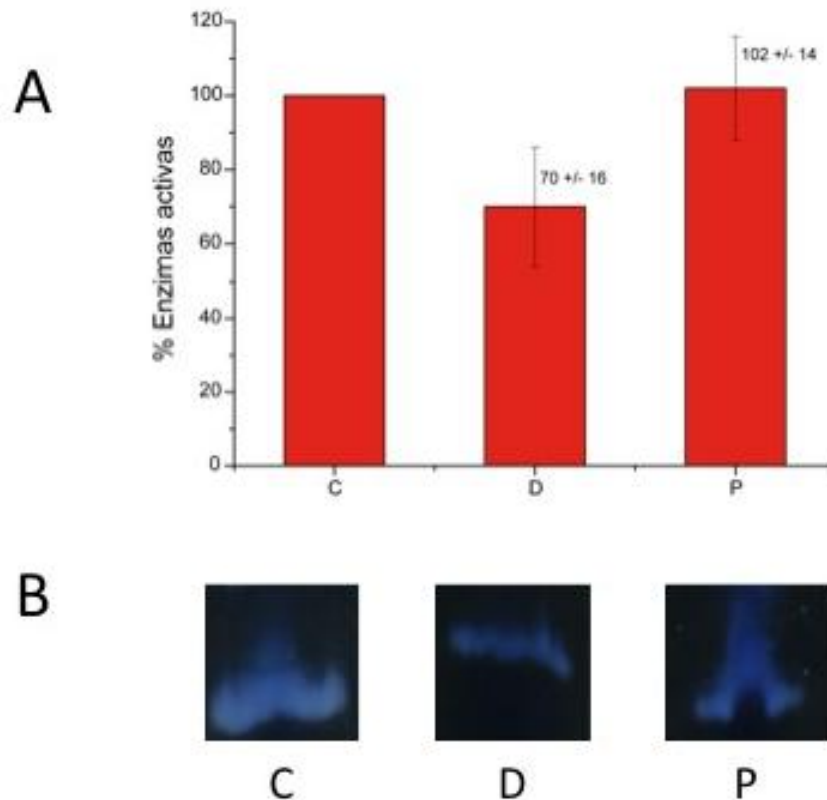


Figura 1. (A) Cálculo densitométrico de bandas de actividad de ATPasa en geles nativos en gradiente, **(B)** correspondientes a la forma monomérica, en extractos de digitonina de mitocondrias de hígado de rata medidas en geles nativos azules de gradiente de un promedio de 6 determinaciones, tomando el control de cada experimento como 100% y calculando una desviación estándar. Las ratas fueron tratadas en las siguientes condiciones: Control (C): ratas wistar macho de 200 g de peso mantenidas en condiciones normales por 18 semanas. (D): Ratas a las que se les administró por inyección intraperitoneal 50 mg por Kg de peso de un cancerígeno (DEN: dietil nitrosamina) inyectadas por 18 semanas, 1 vez por semana. (P): Ratas sometidas a un programa de prevención: inyectadas con la misma dosis de DEN y simultáneamente con un derivado de adenosina (IFC 305) a una dosis de 50 mg por kilo de peso 1 vez por semana por 18 semanas.

Referencias

1. Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Voge, I. F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Körner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W., Cyrklaf, M., Neupert, W., Reichert, A. S. (2009) *J Cell Biol* **185** (6):1047-63.
2. Hackenbrock, C. R., (1966) *J Cell Biol* **30** (2):269-97.
3. Devenish R. J., Prescott, M., Rodgers A. J. (2008) *Int Rev Cell Mol Biol.* **267**: 1-58.
4. Jeffery, C. J. (2003) *Ann. Med.* **35** (1):28-35.
5. Moser, T. L., Stack, M. S., Asplin, I., Enghild, J. J., Højrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H. W., Pizzo, S.V. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**,2811-2816.

6. Cortés-Hernández, P., Domínguez-Ramírez, L., Estrada-Bernal, A, Montes-Sánchez DG, Zentella-Dehesa A, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A, García J J. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **330**(3):844-9.
7. Martinez, L. O., Jacquet, S. Esteve, J. P., Rolland, C., Cabezón, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J. E., Tercé, F., Collet, X., Perret, B., Barbaras, R. (2003) *Nature*. **421** (6918):75-9.
8. Kluck, R. M., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Naiem, S., Yaffe, M. P., Margoliash, E., Bredesen, D., Mauk, A. G., Sherman, F., Newmeyer, D. D. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:16127-33.
9. He, F., Samra, H. S., Tucker, W. C., Mayans, D. R., Hoang E, Gromet-Elhanan, Z., Berrie, CL., Richter ML. (2007) *Biochemistry*. **46**(9)2411-8.
10. Chang ,SY., Park, SG., Kim, S., Kang, CY.(2002) *J. Biol. Chem.* **277**(10)8388-94.
11. Park, M., Lin, L., Thomas, S., Braymer, HD., Smith, PM., Harrison, DH., York, DA.(2004) *Peptides* **25** (12):2127-33.
12. Osanai, T., Tanaka, M., Kamada, T., Nakano, T., Takahashi, K., Okada, S., Sirato, K., Magota, K., Kodama, S., Okumura K. (2001) *J. Clin. Invest.* **108** (7): 1023.
13. Ichikawa, N., Ando, C., Fumino M. (2006) *J .Bioenerg .Biomembr.* **38**(2):93-99.
14. Genoux ,A., Pons, V., Radojkovic, C., Roux-Dalvai ,F., Combes ,G., Rolland, C., Malet, N., Monsarrat ,B., Lopez, F., Ruidavets, JB., Perret, B., Martinez, LO. (2011) *PLoS One* **6** (9): e23949.
15. Sergeant, N., Bombois, S., Ghestem, A., Drobecq, H., Kostanjevecki, V., Missiaen, C., Wattez, A., David, JP., Vanmechelen, E., Sergheraert, C., Delacourte, A.(2003) *J .Neurochem.* **85** (6): 1581-91.
16. Junaid, MA., Pullarkat, RK. (2001) *Adv Genet.* **45**: 93-106.
17. Pérez-Martínez ,X., Funes, S., Camacho-Villasana, Y., Marjavaara, S., Tavares-Carreón, F., Shingú-Vázquez, M. (2008) *Curr. Top. Med. Chem.* **8** (15): 1335-1350.
18. Wallace, DC. (1995) *Am .J .Hum. Genet.* **57** (2): 201-23.
19. Gledhill, JR., Montgomery, MG., Leslie, AG., Walker, JE. (2007) *Proc. Natl. Acad .Sci .U S A.* **104** (40): 15671-15676.
20. Valdés, AM., Dreyfus, G.(1987) *Biochem .Int.* **5**(2):459-466.
21. Mnatsakanyan ,N., Krishnakumar, AM., Suzuki, T., Weber, J. (2009) *J. Biol. Chem.* **284** (17):11336-45.
22. Andrianaivomananjaona ,T., Moune-Dimala, M., Herga, S., David, V., Haraux, F. (2011) *Biochim .Biophys .Acta.* **1807**(2):197-204.
23. Domínguez-Ramírez, L., Gómez-Puyou, A., de Gómez-Puyou, MT. (2006) *Proteins.* **65**(4):999-1007.
24. Papa, S., Zanotti, F., Cocco ,T., Perrucci, C., Candita, C., Minuto, M. (1996) *Eur J Biochem.* **240**(2):461-467. Kagawa ,Y.(2010) *Proc. Jpn .Acad . Phys. Biol. Sci.* **86**(7):667-693.
25. Hernández-Muñoz. R., Díaz-Muñoz, M., López, V., López-Barrera, F., Yáñez, L., Vidrio ,S., Aranda-Fraustro, A., Chagoya de Sánchez, V. (1997) *Hepatology.* **26** (5):1100-10.
26. Wallace ,DC.,Fan, W. (2010). *Mitochondrion* .**10**: 12-31.
27. Arzate-Mejía, RG., Valle-García, D., Recillas-Targa ,F.(2011) *IUBM Life* **63** (10): 907-921.

-
28. Dillin, A., Cohen, E. (2011) *Philos. Trans. Soc. Lond. Biol. Sci.* **12** (1561): 94-98.
29. Hebert, S.L., Lanza, I.R., Nair, K.S. (2010) *Mech. Ageing. Dev.* **131**(7-8):451-62.
30. Seyfried, N.T., Shelton, L.M. (2010) *Nutr. Metab. (Lond.)* ;**7**:7-.
31. Bravo, C., Minauro-Sanmiguel, F., Morales-Ríos, E., Rodríguez-Zavala, J.S., García, J.J. (2004) *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**(3):257-264.
32. Willers, I. M., Cuezva, J. M. (2011) *Biochim Biophys Acta.* **1807** (6): 543-51.
33. Chagoya de S.V., Hernández-Luis, F., Díaz-Muñoz, M., Hernández-Muñoz, R. In *Liver Cirrhosis: Causes, Diagnosis and Treatment*. (2011) Editors Miranda L Michelli. Nova Science Pub. Inc. Chapter 2, pag. 31-58.

Semblanza de la Dra Marietta Tuena de Gómez-Puyou:



La Dra Tuena estudio la carrera de Médico Cirujano en la Facultad de Medicina de la UNAM. Su Doctorado en Bioquímica lo realizó en la Facultad de Química de la UNAM. Es Investigador Emérito del Instituto de Fisiología Celular. Además, es Investigador Emérito del SIN-Conacyt. A sido galardonada con el Premio Universidad Nacional en el área de Biología.

Sus líneas de investigación son:

1. Mecanismo y Regulación de la síntesis de ATP por la ATP sintasa mitocondrial.
2. Proteína inhibidora de la F1F0 (IF1) :
3. Estructura del complejo IF1F1 endógeno.
4. Papel en la oligomerización de F1F0
5. Papel como proteína moonlight en *C. elegans*.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVI, 82 – 94**, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

EL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS IN VITRO E IN VIVO

THE FOLDING OF PROTEINS IN VITRO AND IN VIVO

Armando Gómez Puyou

Departamento de Bioquímica y Biología Estructura, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Ciudad Universitaria, CP 04510, México, DF
apuyou@ifc.unam.mx

Resumen

El mecanismo por el cual una proteína adquiere su estructura terciaria a partir de su secuencia de aminoácidos ha sido un problema que se ha tratado de resolver por muchos años por muchos investigadores. Se han obtenido resultados importantes, sin embargo, todavía hay problemas que aclarar. Una de las preguntas que existen actualmente es si los datos que se han obtenido in vitro reflejan los eventos que ocurren in vivo. En esta breve revisión se mencionan los principales puntos en que los dos procesos parecen mostrar diferencias importantes.

Palabras Clave: Proteínas, estructura terciaria, plegamiento

Abstract

The problem of how a protein acquires its tertiary structure from its amino acid sequence has been studied for a long time by many investigators. Important results have been obtained, however there are still many questions that remain to be

answered. A current question is whether the folding that occurs in vitro reflects the events that take place in vivo. In this brief review, the points in which the two processes apparently differ will be described.

Key words: Proteins, structure folding

Introducción

Las proteínas son las entidades moleculares que directamente ejecutan la miríada de funciones y trabajos que caracterizan de todos los seres vivos. Dado la multitud de trabajos que los organismos vivientes llevan a cabo, no es de extrañar que las proteínas sean unas de las estructuras moleculares más complejas que se conocen y que más han llamado la atención de muchos investigadores de distintas disciplinas. Es interesante que la investigación sobre la naturaleza, estructura y función de estas fascinantes moléculas tiene una historia de varias décadas, y por lo tanto, se podría pensar que dado el tiempo que centenas de investigadores han empleado en estudiarlas ya se sabría con certeza como se forman, adquieren su estructura y trabajan. Sin embargo, las proteínas son entidades moleculares sorprendentes y cada vez es más claro que aún falta mucho por descubrir.

Desde hace muchos años se sabe que las proteínas se forman por la unión de un número muy variable de aminoácidos enlazados unos con otros por medio de uniones peptídicas. Existen proteínas que constan de unas decenas de aminoácidos, pero hay otras que están formadas por cientos de aminoácidos, y algunas contienen varios miles. Un hecho sorprendente en el universo de las proteínas es que, sin importar la especie a la que pertenecen, todas están integradas por solo 20 aminoácidos diferentes (se debe mencionar que algunas proteínas contienen un par de aminoácidos distintos a los convencionales, pero éstas son poco frecuentes). El que con solo 20 aminoácidos se puedan formar miles de proteínas diferentes obviamente llamó la atención de los investigadores, los cuales después de algunos estudios llegaron a la conclusión de que el orden en que están colocados los aminoácidos que las constituyen es lo que le confiere a las distintas proteínas estructuras tridimensionales únicas, y en consecuencia, cada una de ellas puede llevar a cabo una función específica. Naturalmente para los que deseaban conocer íntimamente las proteínas, el conocimiento de la secuencia de los aminoácidos que forman a las proteínas se hizo imperativo.

Con el desarrollo de la biología molecular y el desarrollo muy impresionante de tecnologías de secuenciación de nucleótidos y aminoácidos ahora es posible conocer de manera relativamente fácil, la secuencia de aminoácidos de la proteína que se quiera. Casi en paralelo a estos avances, se desarrolló la cristalografía y la resonancia magnética nuclear; como resultado ahora se conoce la estructura de miles de proteínas a nivel atómico. De igual importancia es que toda esa información está accesible en los llamados bancos de datos. Cada uno de los logros mencionados es un triunfo de la ciencia contemporánea, sin embargo, aún no se conoce con certeza y en su totalidad como se forman las proteínas, ni cómo una secuencia de aminoácidos origina una

estructura tridimensional precisa con la capacidad de realizar una función única. En este capítulo se describen algunos de las incógnitas sobre la formación de las proteínas tanto in vitro como in vivo que, desde el punto de vista del autor, ameritan ser explorados.

Plegamiento de las proteínas in vitro

El dogma en los estudios sobre como las proteínas adquieren una estructura tridimensional precisa y fisiológicamente competente surgió hace cerca de 40 años cuando Anfinsen [1] demostró que una enzima desplegada por la acción de un agente desnaturante adquiriría su estructura nativa cuando se eliminaba el desnaturante en presencia de agentes reductoras. El hallazgo ha sido la base de mucha de la investigación actual, de hecho hay cientos de trabajos con una multitud de enzimas diferentes que validan la observación. En su conjunto estas observaciones indican claramente que la información para lograr un plegamiento funcional depende del orden en que están colocados sus aminoácidos, y que además el proceso es espontáneo. Dado que la información para el plegamiento correcto reside en su secuencia de aminoácidos, las preguntas que surgen son ¿Cuál es la naturaleza de esa información? y ¿cómo se manifiesta dicha información?.

Para empezar, se puede considerar que el plegamiento ocurre por interacciones al azar entre los distintos aminoácidos de una cadena polipeptídica. Obviamente que esta posibilidad se evaluó, y se encontró que si se toma en cuenta el número de posibilidades de interacción entre los distintos aminoácidos que integran una proteína para que finalmente se forme una estructura exitosa, resulta que el tiempo que se necesitaría para obtener una proteína correctamente plegada no es compatible con la existencia del mundo biológico [2]. Dada esta situación, surgieron hipótesis y se hicieron experimentos, tanto in vivo como in vitro, para tratar de entender como las proteínas adquieren la estructura correcta a partir de su estructura primaria.

Los experimentos in vitro generalmente consisten en desnaturar a una proteína utilizando algún agente químico como urea o alguna sal de guanidina, o por medio de agentes físicos como calor y presión. A continuación se remueve el agente desnaturante y se empieza a registrar los eventos que ocurren en el camino de la proteína hacia su estructura nativa. En varios casos, se ha observado que el plegamiento sigue un camino secuencial, o sea que en la ruta del plegamiento existen intermediarios. A partir de las observaciones y con el deseo de tener un modelo de los eventos que se observaban apareció el modelo del embudo [3]. El modelo refleja en forma gráfica la ruta que sigue una proteína desplegada hacia la estructura nativa. Se visualiza que la proteína desplegada viaja de la parte superior del embudo a través de múltiples estados y distintas conformaciones hasta que finalmente se llega al fondo, el cual se visualiza como el estado en que la proteína está en su conformación nativa y en un nivel de mínima energía.

Un punto importante en el modelo del embudo es que la proteína puede llegar por distintos caminos a su estado final, lo cual se ha demostrado experimentalmente.

Por ejemplo, en un estudio sobre la cinética y energética del camino que sigue las triosafosfato isomerasa de distintas especies y recopilación de datos de la literatura [4] se observó que en su ruta de plegamiento, cada una de las enzimas muestra distintas relaciones de velocidades en los diferentes pasos de la ruta del plegamiento, a pesar de que en todas se llega al estado funcionalmente activo. Esto implica que dependiendo del camino hacia la forma nativa, la proteína puede encontrar obstáculos (o adquiere conformaciones) que retrasan, pero no impiden, su viaje hasta el estado final. Cabe mencionar que los obstáculos son de naturaleza cinética, ya que al final del viaje se llega al mismo estado.

Los datos que se han obtenido en numerosos laboratorios sobre la adquisición de una estructura nativa a partir de una cadena polipeptídica desplegada y desordenada por algún agente desnaturizante demuestran claramente que la estructura primaria de las proteínas contiene la información para formar las proteínas que llevan a cabo el trabajo celular. Por otro lado, los experimentos han sido fundamentales para entender la cinética y la termodinámica del proceso de plegamiento. Sin embargo, cuando se examina la literatura se encuentran situaciones que no encajan fácilmente con la reacción:

Secuencia de aminoácidos → Proteína nativa

A pesar de que se incluyan pasos intermedios. Por ejemplo, en muchas proteínas se ha encontrado que después de desnaturizarlas y eliminar el agente desnaturizante, solo una porción vuelve a su estado nativo, e incluso hay algunas en las que ni siquiera una pequeña porción se llega a plegar correctamente [5]. Se ha explorado la causa de este fenómeno y una de las explicaciones es que en la ruta de plegamiento existe un intermediario del plegamiento que puede seguir dos caminos:

Proteína desplegada ↔ Intermediario ↔ Proteína nativa

↓
Estructura incorrecta
(agregados)

En la secuencia de reacciones, es fácil visualizar que el intermediario puede dar lugar a estructuras nativas, pero también transformarse en una proteína que no tiene la estructura correcta. Cuando se sigue el camino equivocado, es frecuente que las proteínas incorrectamente plegadas formen agregados, lo cual indica que en la superficie del intermediario existen grupos hidrofóbicos cuya tendencia natural es interactuar con grupos similares de otras proteínas que también tienen una conformación equivocada.

Como en cualquier proceso químico o metabólico, la secuencia de reacciones ilustrada arriba implica cambios en energía libre (ΔG). Los experimentos *in vitro* indican que es posible pasar del estado desnaturizado al renaturizado sin aportes energéticos externos. Esto quiere decir que el proceso ocurre espontáneamente y por tanto tiene un ΔG favorable. Por otro lado, e independientemente de la naturaleza del

intermediario, la secuencia de reacciones implica que en la formación de la proteína nativa o las estructuras incorrectas también intervienen factores cinéticos.

De hecho, sí se examina la secuencia de reacciones, se puede ver fácilmente que si la velocidad de la reacción del intermediario hacia la proteína nativa es mayor que la que se dirige hacia las estructuras incorrectas, sería difícil que en el proceso de formación de proteínas nativas se formaran estas últimas. Viceversa, si la velocidad de la reacción hacia las estructura incorrectas es mayor que la de la reacción que da lugar a la estructura nativa, la formación de estructuras incorrectas sería mayor que la de estructuras correctas. En última instancia, la secuencia de reacciones implica que en la formación de proteínas participan factores termodinámicos, esencialmente el cambio de energía libre entre el estado inicial (proteína desplegada) y final (proteína nativa), que siempre son favorables para la formación de estructuras nativas y funcionales. Pero, como se muestra en la serie de reacciones, la formación de proteínas también está sujeta a factores cinéticos.

Generalidades del plegamiento de proteínas in vitro e in vivo

Los experimentos in vitro han sido fundamentales en el desarrollo de los conceptos actuales sobre los mecanismos y factores que participan la formación de las proteínas; es importante añadir que, por medio de experimentos in vitro, también se ha logrado determinar la estabilidad termodinámica de las proteínas e intermediarios en su camino hacia la estructura nativa [4]. Sin embargo, una pregunta que por muchos años ha estado en la mente de los investigadores es si los experimentos in vitro reflejan los eventos que ocurren in vivo. Las dudas están plenamente justificadas y una parte del problema, en particular la formación de agregados en el interior celular, se resolvió cuando se descubrieron y se conoció el mecanismo de acción de un tipo particular de proteínas, que genéricamente se han llamado chaperonas. Estas moléculas atrapan a proteínas parcialmente plegadas y las liberan en el momento adecuado. Por medio de su acción, se previene, o cuando menos se disminuye, la formación de proteínas incorrectas. También se descubrieron enzimas que catalizan la transformación de algunos aminoácidos de la forma cis a la forma trans; su función es conferir rápidamente al aminoácido una conformación que favorezca y establezca su interacción con otros aminoácidos de la proteína. La existencia y acción de estas enzimas eliminan, o cuando menos disminuyen, la posibilidad de que una proteína siga por un camino indeseable.

De cualquier forma, la inquietud continúa, especialmente cuando se comparan los sistemas experimentales que generalmente se emplean para evaluar como ocurre la formación de una proteína in vitro y como sucede la formación de las proteínas en el interior celular. Como se mencionó, los experimentos in vitro se llevan a cabo con proteínas que ya han sido aisladas y purificadas de alguna fuente biológica, o de extractos de células en las que se previamente se había sobre-expresado la proteína deseada. En otras palabras, en los experimentos in vitro, se parte de una cadena de aminoácidos que previamente adquirió su estructura correcta.

In vivo, la formación de una proteína es un proceso mucho más complicado en el que participan reacciones y procesos que, en general, no se toman en cuenta en los sistemas in vitro. Unos datos relevantes sobre si el plegamiento de las proteínas es diferente in vivo e in vitro surgieron de experimentos que mostraban que las conformaciones en la cadena polipeptídica naciente en el ribosoma son diferentes a las que se habían observado in vitro [6]. Lo cual sugirió que in vivo e in vitro, el plegamiento de las proteínas podía ocurrir a través de rutas diferentes.

La maquinaria celular de síntesis de proteínas

La biosíntesis de las proteínas en el interior de las células se lleva a cabo en los ribosomas, unas estructuras enormes y complicadas, a través de un proceso secuencial en el que en cada paso intervienen distintas moléculas. Como se describe en cualquier libro de bioquímica, en la síntesis de una proteína participa un RNAm que se coloca en una posición precisa entre la subunidad grande y pequeña del ribosoma. En el siguiente paso intervienen los RNAts cargados con sus aminoácidos correspondientes. Después de una serie de señales y arreglos moleculares e interacciones entre codones y anti-codones, un aminoácido se enlaza a otro; el ciclo se repite con otro aminoácido que previamente se unió a su RNAt y se transfirió hacia el complejo ribosoma-RNAm, y así sucesivamente. Por tanto, in vivo la cadena polipeptídica crece a partir de su amino terminal residuo por residuo, hasta que finalmente se enlazan todos los aminoácidos que constituyen a la proteína. Cuando se llega a este punto, la proteína, por medio de una señal de paro, se libera del ribosoma.

Son muchos los factores cinéticos y estructurales que ocurren en el ensamble de los aminoácidos a nivel de los ribosomas. Pero uno de los más intrigantes es la existencia de un túnel en la subunidad grande de los ribosomas. Se ha demostrado que después de que un amino aminoácido se enlaza a otro, el primer aminoácido (el amino terminal) penetra al túnel, y en la medida que se van enlazando más aminoácidos, el primer aminoácido y los que los siguen se desplazan a través del túnel. Como resultado, durante la síntesis de proteínas, el túnel siempre está ocupado por residuos que se ven enlazando unos con otros a partir de su amino terminal. Cuando unos 20 o 30 aminoácidos (el número preciso aún no está muy bien definido) se han enlazado y pasado a través del túnel es cuando el amino terminal de la proteína sale al exterior de los ribosomas. El proceso continúa hasta que todos los aminoácidos de la proteína se han enlazado y han pasado a través del túnel. Es bastante peculiar que el diámetro interior del túnel es lo suficientemente grande para acomodar una α -hélice, lo cual ha llevado a pensar que en el túnel se puedan formar este tipo de estructuras, [7], o sea, que el plegamiento de una proteína se podría iniciar cuando solo unos cuantos aminoácidos se han enlazado.

Plegamiento co-transduccional

Otra pregunta sobre la biosíntesis de las proteínas es si la que emerge del túnel del ribosoma es una cadena polipeptídica desordenada que posteriormente adquiere su estructura tridimensional. En principio es difícil aceptar que en el interior de las células,

una proteína que acaba de nacer exista como una cadena polipeptídica desplegada. Además de problemas de espacio, todas las proteínas contienen residuos hidrofóbicos cuya tendencia natural en el medio acuoso intracelular es la de interactuar con otros aminoácidos apolares. Puesto en otra forma, en términos energéticos, la existencia de una estructura proteica desplegada en el interior celular es difícil de concebir; en consecuencia, se puede hipotetizar que desde que se inicia la formación de una cadena polipeptídica, sus aminoácidos empiezan a interactuar. El pensamiento parece correcto, pero uno se pregunta si existe evidencia de que esta línea de pensamiento es cierta. Incluso se puede aceptar que dadas las características físico-químicas de los aminoácidos es muy factible que en una proteína naciente, unos aminoácidos interactúen con otros, pero entonces surge la pregunta si esas interacciones son relevantes en la formación de la estructura nativa.

Los experimentos para abordar el problema no son fáciles, se requiere estudiar y caracterizar, o cuando menos determinar, si la proteína naciente unida al ribosoma muestra alguna de las características estructurales o funcionales de la proteína nativa. A pesar de lo difícil del problema ha habido resultados ilustrativos. En uno de los primeros estudios, Mekeyev et al [8], a partir de datos en los que se había visto que la luciferasa unida a los ribosomas no mostraba actividad, pensaron que la falta de actividad se debía a que los aminoácidos de la porción carboxi-terminal de la luciferasa aún estaba sumergida en el ribosoma. Para examinar esa posibilidad, los autores alargaron la cadena polipeptídica a partir de su residuo carboxi-terminal con 26 residuos y encontraron que la proteína unida a los ribosomas efectivamente tenía actividad catalítica.

Además de las observaciones anteriores existen otros datos que apoyan la idea de que la proteína naciente unida a los ribosomas posee una estructura funcional. Por ejemplo, la unión de ligandos, como el grupo hemo, a una proteína requiere que la proteína tenga un sitio en la conformación precisa para aceptar y unir dicho ligando. Se ha visto que la globina unida a los ribosomas puede unir el grupo hemo cuando solo sus primeros 86 residuos se han enlazado [9] En las proteínas nacientes aún unidas a los ribosomas también se ha visto que éstas pueden unir anticuerpos específicos [10], de igual manera, se ha observado que en las proteínas unidas a ribosomas se establecen puentes disulfuro en los sitios correctos [11].

Los ejemplos anteriores son solo algunos de una lista relativamente grande de trabajos que ilustran que las proteínas nacientes pueden plegarse y adquirir una estructura que mimetiza la acción de las proteínas nativas, ver por ejemplo, las revisiones de Komar [12] y Marín [13] sobre el plegamiento co-traducciona.

Plegamiento de las proteínas in vivo

Los estudios sobre la renaturalización de proteínas in vitro han revelado que proteínas relativamente pequeñas se pueden plegar a su estructura nativa en tiempos de segundos o menos, y que la adquisición de estructura secundaria y contactos entre los residuos que integran a una proteína puede ocurrir en escalas de tiempo mucho

más cortas [14]. La biosíntesis de proteína in vivo es más lenta, a nivel del ribosoma se enlazan entre 2 y 4 aminoácidos por segundo [15], aunque también se ha descrito que la velocidad es de aproximadamente 12 residuos por segundo [16]. En una forma u otra, las cifras son interesantes ya que sugieren que el paso limitante en la síntesis de la proteína in vivo es la formación de la cadena polipeptídica.

En este sentido, es apropiado mencionar que desde hace más de dos décadas se consideró que el plegamiento correcto de una proteína podría estar modulado por la velocidad a la que un aminoácido se enlaza con otro a nivel del ribosoma [17]. Es interesante que los autores del trabajo escribieran: "... we suggest that their (de las cadena polipeptídicas) gene sequences have evolved to control the rate of translational elongation such that the synthesis of defined portions of the polypeptide chain is separated temporarily...". En su trabajo, los autores llamaron la atención a la posibilidad de que durante el alargamiento de una cadena polipeptídica, los aminoácidos no se enlazarán a una velocidad constante, sino que en la síntesis de una cadena polipeptídica existieran retrasos o pausas que estaban dictados por la traducción de determinados codones. Los autores sugirieron además que las pausas son fundamentales en la formación de las proteínas funcionalmente activas. Obviamente que la pregunta que surgió era que si en realidad existen dichas pausas, y en caso de existir, si éstas son necesarias en la formación de una proteína.

Una de las ideas que surgieron fue que las pausas sirven para que la porción de la cadena polipeptídica que ya estaba formada tuviera tiempo para adquirir una estructura terciaria que fuera indispensable para que el resto de la proteína adquiriera la conformación correcta. En cierta forma, las pausas serían equivalentes a las comas de nuestros textos y cuya utilidad es proporcionar coherencia al escrito. Por lo tanto, es importante examinar si hay factores que pudieran ocasionar pausas en el crecimiento de la cadena polipeptídica.

En relación a este punto, es interesante recordar que la información del DNA del núcleo se transmite a los ribosomas por medio del RNAm que contiene los codones que interactúan específicamente con un triplete de bases de un RNAt que transporta determinado aminoácido. Es un tanto peculiar que aunque la materia prima para la síntesis de proteínas son los 20 aminoácidos canónicos, en el mundo biológico existen 61 codones (hay otros tres codones que sirven como señal de paro). Esto simplemente implica que hay más de un codón y más de un RNAt (con su respectivo anti-codón) para cada aminoácido. Los estudios que se hicieron hace varios años confirmaron que, excepto para triptofano y metionina (en que solo hay un codón para cada uno de ellos), para los 18 aminoácidos restantes existen varios codones y, en consecuencia, varios RNAt para cada uno de ellos. El número de codones para cada uno de los 18 aminoácidos es variable, siendo los codones para arginina y leucina los más abundantes, seis para cada uno de ellos.

A los codones que codifican para más de un aminoácido se la ha llamado "sinónimos", ya que codifican para el mismo aminoácido, pero debido a que algunos son más frecuentes que otros, a los menos frecuentes se les ha llamado codones "raros". Cabe aclarar que cada especie tiene un uso de codones particular; en otras

palabras en distintas especies biológicas existen relaciones diferentes entre codones raros y frecuentes. Ya que la abundancia y relación entre codones raros y frecuentes es variable en diferentes especies, el término codones raros puede ser aplicable en algunas especies, pero no necesariamente en otras. Ya que los codones sinónimos, ya sean raros o frecuentes, codifican para el mismo aminoácido, se podría esperar que no importaría el codón sinónimo que se emplee, la proteína resultante tendría ese residuo, visto desde este punto de vista, a este tipo de codones también se les ha calificado como codones “silenciosos”. Aunque las aseveraciones anteriores son correctas, se ha encontrado que el uso de codones tiene implicaciones importantes en la estructura de la proteína que surge de los ribosomas (ver revisiones [12] y [13]).

En la actualidad, por medio de la bioinformática se exploran los aspectos evolutivos del código genético y se ha encontrado que éste es un fenómeno complejo que, entre otras cosas, está relacionado con el uso de codones en diferentes especies. El hallazgo tiene implicaciones teóricas y prácticas. Por ejemplo, hace pocos años se observó [18] que una mutación “silenciosa” en el gene que codifica para la proteína P-gp que participa en el transporte de drogas, da lugar a una proteína con características estructurales y cinéticas diferentes a la proteína que está codificada “correctamente”. A la luz de estos datos, uno se puede preguntar si el uso de codones contribuye de manera similar en la formación de otras o todas las proteínas. La pregunta está abierta; algunos estudios sobre el uso de codones y su posible participación en los mecanismos de síntesis de las proteínas y la adquisición de su estructura funcional se mencionarán más adelante.

Desde el punto de vista tecnológico, el uso de los codones es particularmente importante. Ya que cada especie tiene un patrón definido de uso de codones, ha surgido la pregunta sobre si la expresión de proteínas en sistemas heterólogos se podría mejorar tomando en cuenta este factor. Por ejemplo, uno de los sistemas más usados para la expresión de proteínas es *Escherichia coli*, sin embargo la bacteria tiene un uso de codones que en muchos casos difiere de la especie de la que provino la proteína que se desea expresar. En gran medida, el problema se ha resuelto utilizando células en el que las secuencias codificantes se han optimizado. Otra de las formas para mejorar el sistema de producción de la proteínas es introduciendo en el gene codones que son aceptados por el sistemas biológico de expresión. En un caso muy ilustrativo sobre el uso de codones en la expresión de proteínas en sistemas heterólogos [19], se encontró que efectivamente, la expression del gene de una proteína que fija ácidos grasos proveniente de *Echinococcus granulosos* en *E. coli*, se afecta drásticamente por el uso de codones; además, los autores vieron que éstos son particularmente importantes en la porción que une dos α - hélices de la proteína. Lo anterior apoya la idea de que el el uso de codones puede jugar un papel central en el plegamiento in vivo de la proteína.

La influencia que puede tener el uso de codones en la formación de proteínas, en especial los codones raros, es un campo muy activo, en gran medida por su importancia biotecnológica. Entre otras cosas, se ha visto que hay relación entre la eficiencia de la traducción de cada codón y la abundancia de RNAs que participan en la traducción de ese codón [20]. Esto puede indicar que la síntesis de una proteína se

puede detener o dar una estructura no deseable si en el RNAm existe un codón para el cual existe una baja concentración del RNAt que reconoce ese codón. En ese punto, puede ocurrir una pausa en la síntesis de la cadena polipeptídica que puede (o no) tener repercusiones sobre la cantidad de proteína final. De hecho, se ha documentado que la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* puede verse afectada por la presencia de codones raros en el gene de la proteína que se desea expresar. En *E. coli*, los codones particularmente importantes son los que codifican arginina, isoleucina y leucina. En este caso la pausa está directamente relacionada con la concentración relativamente baja de los RNAt para dichos aminoácidos. Para solucionar el problema se han fabricado cepas de expresión que resuelven el problema, una de ellas es la llamada CodonPlus de *E. coli* en la que se sobreexpresan los genes que codifican genes para RNAt que reconocen los codones raros para arginina, isoleucina y leucina [21].

Los estudios que se han mencionado se han hecho en sistemas de expresión heterólogos, así es que cabe la pregunta de si existen factores de regulación en la velocidad de la traducción que tengan importancia fisiológica. Zhang y cols [22] estudiaron las causas de que dos isoformas de la actina presentaran diferentes estabilidad y sensibilidad a ubiquitinilación. El grupo encontró que la forma menos estable posee una lisina expuesta al solvente, lo cual la hace susceptible a reaccionar con ubiquitina. Lo fascinante de los datos es que las características de la última se relacionan con la secuencia de nucleótidos en el gene, lo cual resultaba en diferentes velocidades de traducción.

Hay un punto que vale la pena señalar. Como se mencionó anteriormente, en la medida que se unos aminoácidos se enlazan con otros, la cadena polipeptídica creciente viaja a través del túnel ribosomal. En términos muy simples, esto quiere decir que el plegamiento hacia la estructura terciaria de la proteína tendría que ocurrir después de unos que unos 20 a 30 residuos se han enlazado. De esta manera, se puede suponer que un retraso en la formación de una una peptídica tendrá impacto en los 20 o 30 que se ensamblaron previamente y que salieron del ribosoma, y no en la zona del residuo que se está uniendo a otro.

Errores en la formación de proteínas

Los trabajos anteriores muestran que las pausas en el enlace de un aminoácido con otro pueden afectar la estructura final de las proteínas que salen del ribosoma. Sin embargo, a pesar de que los hallazgos son convincentes, no es posible concluir que las pausas en el ensamble de los aminoácidos de una proteína siempre tienen repercusiones en la estructura y propiedades de todas las proteínas que se sintetizan in vivo. Existen numerosas observaciones en muchos laboratorios que demuestran que en sistemas heterólogos, a pesar de que el gene posea codones raros, se obtienen proteínas funcionalmente activas y estructuralmente correctas. En una forma u otra, las observaciones ciertamente sugieren que en el campo de la cinética en la formación de proteínas hay puntos que es importante definir.

Los estudios sobre las pausas que pueden ocurrir durante la formación de las proteínas indican que la cinética de su síntesis puede influir de manera importante en la adquisición de la estructura terciaria de las proteínas. Sin embargo, esa no es toda la historia. También se ha demostrado experimentalmente que los sitios con codones raros son susceptibles a sufrir errores en la traducción de dicho codón. En un estudio relativamente reciente [23] se encontró que cuando el gene de la triosafosfato isomerasa de humano se expresaba en *E. coli* BL21, se obtenían dos enzimas claramente distinguibles. En estudios posteriores se observó que cuando la expresión se llevaba a cabo en la cepa CodonPlus (que contiene un exceso de RNAt para arginina, isoleucina, y leucina), únicamente se expresaba una de las dos formas. Posteriormente se observó [24] que la formación de una de las dos formas de la enzima que se había expresado en *E. coli* BK21 se debía a un error en la traducción en un codón raro para arginina que resultaba en la incorporación de lisina. El error en la traducción de arginina por lisina no es extraño, se han estudiado los factores involucrados en los errores de traducción y se ha encontrado que en gran parte se deben a la relación de concentraciones entre los RNAt para arginina y lisina [25, 26].

El medio intracelular en la formación y estabilidad de las proteínas

Finalmente es necesario recordar que los estudios in vitro se llevan a cabo en condiciones controladas de pH, sales, temperatura y concentración de proteína. A pesar de las precauciones, las condiciones son distintas a las condiciones que ocurren en el interior de las células. Una diferencia importante entre las dos condiciones es que la concentración de proteína en el medio intracelular puede ser hasta de 300 o 400 mg de proteína por ml, lo cual puede tener efectos drásticos sobre la actividad termodinámica del agua en el espacio celular. Pero existen otros factores, por ejemplo se ha estudiado in vitro si la presencia de proteínas afecta la velocidad de plegamiento y estabilidad de proteínas. Sorprendentemente se encontró [27] que la velocidad y magnitud del plegamiento de varias proteínas se afecta favorablemente por la presencia de proteínas marcadamente diferentes a las que se estudiaban. Cuando se estudió el fenómeno con más detalle se encontró que las interacciones débiles entre diferentes proteínas contribuyen de manera importante a su estabilidad.

En resumen, la pregunta sobre como las proteínas adquieren su estructura tridimensional fisiológicamente activa no se puede contestar totalmente. La razón es que a pesar de que los estudios se hacen con cuidado e imaginación y arrojan datos incontrovertibles, se encuentra que son demasiados los factores que participan en la formación de estas grandes biomoléculas. Por tanto, tal vez no sorprenda que en la medida que se profundiza sobre la biosíntesis de las proteínas y se empiezan a tomar en cuenta los eventos que ocurren en el interior celular, surgen datos que simplemente no se explican de manera simplista con los dogmas y mecanismos conocidos hasta ahora. La pregunta sobre cual es y como se expresa el código que rige la formación de estructuras terciarias y cuaternarias aún está vigente. Entre otras cosas parece que un componente importante en el código genético involucra factores cinéticos, es decir el código genético no es simplemente codón – aminoácido incorporado, de hecho, un factor que puede estar involucrado en la adquisición de la estructura terciaria de una

proteína es la velocidad a la que se enlazan los distintos aminoácidos. Finalmente, es conveniente recordar que la mayoría de las enzimas son oligómeros. Los mecanismos de oligomerización in vitro se ha estudiado mucho, pero aún hay pocos datos sobre la biosíntesis de oligómeros en el interior celular.

Referencias

1. Anfinsen, C. B. (1973) *Science* **181**, 223-230.
2. Levintal, C. (1968) *J. Chem. Phys.* **65**, 44-45.
3. Onuchic, J. N. y Wolynes, P. G. (2004) *Curr. Opin Struct Biol.* **14**, 70-75.
4. Nájera, H., Costas, M. y Fernández-Velasco, D. A. (2003) *Biochem. J.* **370**, 785-92.
5. Jaenicke, R. (1991) *Biochemistry.* **30**, 3147-3161.
6. Clark, P. L. y King, J (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 25411-25420.
7. Ziv, G. (2005) *Proc. Natl Acad. Sci USA* **102**, 18956-18961.
8. Makeyev, E. V., Kolb, V. A. y Spirin, A. S. (1996) *FEBS Lett.* **378**, 166-170.
9. Komar, A. A., Kommer, A., Krasheninnikove y Spirin, A. S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 10646-10651.
10. Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L., King, J., y Goldberg M. E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15945-15949.
11. Bergman, L. W. y Kuehl, W. M. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5690-5694.
12. Komar, A. A. (2008) *Trends Biochem. Sci.* **34**, 16-24.
13. Marín, M. (2008) *Biotechnol. J.* **3**, 1047-1057.
14. Dobson, C. M. (2003), *Nature* **426**, 884-890).
15. Netzer, W. J. y Hartl, F. U. (1997) *Nature* **388**, 343-349.
16. Wen, J. D., Lancaster, L., Hodges, C., Zeri, A. C., Yoshimura, S. H., Noller, H.F., Bustamante, C, y Tinoco, I. (2008) *Nature.* **452**, 598-603.
17. Purvis, I. J., Andrew J., E., Bettany, T., Santiago, C., Coggins, J. R., Kenneth Duncan, K., Eason, R., Alistair J.P. y Brown, A. J. P. (1987) *J. Mol. Biol.* **193**, 413-417.
18. Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I. W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. V., y Gottesman, M. M. (2007) *Science.* **315**, 525-528.
19. Cortazzo, P., Cerveñansky, C., Marín, M., Reiss, C., Ehrlich, R. y Deana, A. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 537-541.
20. Tuller, T., Carmi, A., Vestsigian, K., Navon, S., Dorfanm Y., Zaborskem J., Pan, T., Dahan, O., Furmanm I. y Ipelm, Y. (2010) *Cell.* **141**, 346-354.
21. Rossano, G. I. y Ceccarilli, E. A. (2009) *Microbial Cell Factories* **8**, 41.
22. Zhang, F., Saha, S., Shahabalina, S. A. y Kashima, A. (2010) *Science.* **329**, 1534-15379.
23. Rodríguez-Almazán, C., Arreola, R., Rodríguez-Larrea, D., Aguirre-López, B., de Gómez-Puyou, M. T., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Gómez-Puyou, A. y Torres-Larios. A. (2008) *J. Biol. Chem.* **284**, 23254-23263.
24. Aguirre, B., Costas, M., Cabrera, N., Mendoza-Hernández, G., Helseth, D. L. Jr., Fernández, P., de Gómez-Puyou, M. T., Pérez-Montfort, R., Torres-Larios, A., y Gómez- Puyou, A. (2011) *PLoS One.* **6**, e21035.
25. Kramer, E. B. y Farabaugh, P. J. (2007) *RNA.* **13**, 87-96.

26. Kramer, E. B., Vallabhanenni, H., Mayer, L. M., y Farabaugh P. J. (2010) *RNA*. **16**, 1797-1808.
27. Rodríguez-Almazán, C., Torner, F. J., Costas, M., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., y Gómez Puyou, A. (2007) *PLoS One* 2, e497.

Semblanza del Dr. Armando Gómez Puyou



Es investigador emérito en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Sus principales intereses han sido la fosforilación oxidativa mitocondrial, el papel de agua en la catálisis enzimática, el diseño de fármacos contra *Trypanosoma cruzi*, y la estructura y función de las proteínas.

Ingresó a la Universidad Nacional Autónoma de México en 1956 como asistente de profesor en la Facultad de Medicina; obtuvo el título de Médico Cirujano en 1960 y en 1974 el grado de doctor en ciencias (bioquímica), en la Facultad de Química, de la misma universidad. Profesor e investigador titular en el Instituto de Fisiología Celular. Premio Universidad Nacional en Investigación en Ciencias Naturales, 1989. Investigador emérito del Instituto de Fisiología Celular, designado el 6 de diciembre de 1994. Premio Nacional de Ciencias y Artes 2004, en Ciencias Físico-Matemáticas y Naturales.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVI, 95 – 105, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

SEÑALES DE CARDIOPROTECCIÓN EN EL CORAZÓN POST-ISQUÉMICO

CARDIOPROTECTION SIGNS POST-ISCHEMIC HEART

Sauri Hernández-Reséndiz, Mabel Buelna-Chontal, Francisco Correa, Alejandro Silva y Cecilia Zazueta.

Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
Juan Badiano No. 1. Colonia Sección XVI. Tlalpan, México 14080, D.F.
azazuetam@yahoo.com

Resumen

El tratamiento indicado para reducir el tamaño del infarto en la patología isquémica cardíaca es la reperfusión arterial coronaria. A pesar de que este procedimiento se ha optimizado notablemente mediante diversas técnicas, paradójicamente contribuye a aumentar la tasa de mortalidad en pacientes, constituyendo un factor de riesgo extra para el miocardio isquémico. A este fenómeno se le conoce como daño por reperfusión y se ha ligado íntimamente con la función mitocondrial.

Estudios recientes demuestran que el corazón isquémico puede activar mecanismos endógenos de protección ante el daño por reperfusión, si se le acondiciona con periodos cortos de hipoxia y normoxia. Este acondicionamiento induce la activación

de cascadas de señalización que son integrados por la mitocondria, determinando el destino final de la célula cardíaca.

Palabras clave: cardioprotección, mitocondria, cascadas de señalización.

Abstract

Coronary artery reperfusion is the indicated treatment to reduce infarct size in ischemic pathology. Although this proceeding has been optimized through diverse techniques, paradoxically contributes to increase mortality among patients, becoming an extra risk to the ischemic myocardium. A close relationship between this phenomenon and mitochondrial function has been established.

Very interestingly, recent studies have demonstrated that the ischemic heart posses the ability to activate endogenous protective mechanisms after the application of short cycles of hypoxia and normoxia. Such ischemic conditioning activates signaling cascades that are integrated by mitocondria, determining the final fate of the cardiac cell.

Key words: cardioprotection, mitocondria, signaling cascades.

INTRODUCCIÓN

En México y en el mundo, las enfermedades del corazón y en particular el infarto agudo al miocardio (IAM) ocupan el primer lugar entre las causas de muerte según estadísticas recientes [1]. El infarto al miocardio produce necrosis y la pérdida contráctil de los cardiomiocitos en la periferia de la arteria coronaria afectada (Figura 1A). El área del daño por el evento isquémico agudo, incluye tanto a las células dañadas permanentemente como a aquellas con una pérdida temporal de la función contráctil, condición a la que se conoce como “miocardio aturdido” [2]. También incluye a los cardiomiocitos sobrevivientes que pudieron adaptarse a un medio persistentemente isquémico a través de modificaciones fenotípicas que reducen su contractilidad (hibernación), pero que con el tiempo derivan en un miocardio estructuralmente degenerado, aumentando la región del ventrículo izquierdo que será permanentemente hipocontráctil.

Todos estos factores alteran significativamente la esperanza de sobrevivida de los pacientes. El tratamiento indicado para reducir el tamaño del infarto en la patología isquémica cardíaca es la reperfusión arterial coronaria (Figura 1B), que a pesar de ser un procedimiento que se ha optimizado notablemente mediante técnicas de intervención

primaria percutánea y trombolisis, paradójicamente, contribuye a aumentar la tasa de mortalidad, por lo que constituye un factor de riesgo extra para el miocardio isquémico.

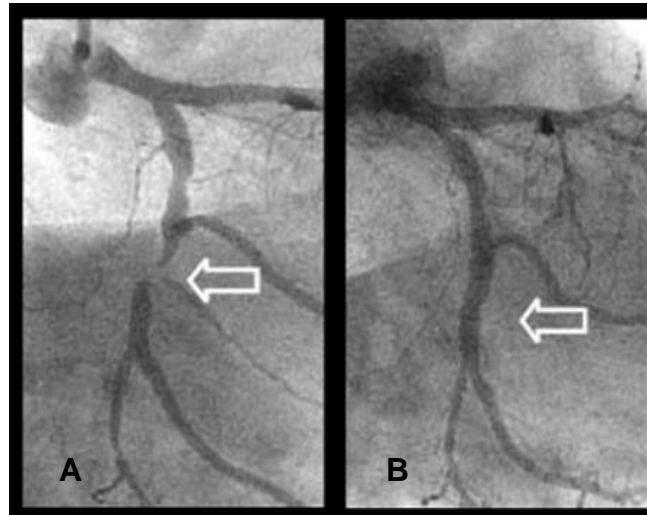


Figura 1. Infarto agudo al miocardio antes y después de la reperusión. **A)** Area afectada por constricción de la arteria coronaria izquierda durante el IAM y **B)** Imagen de la zona tras la aplicación de intervención primaria percutánea y restauración del flujo de reperusión.

Daño por reperusión

Este fenómeno, descrito por primera vez en los años 70's por Jennings y Kloner [3] causa daño estructural y funcional adicional al que sufre el miocardio durante el periodo isquémico. En modelos animales se ha demostrado que como consecuencia del daño por reperusión, se incrementa hasta en un 50% el tamaño final de la zona infartada [4]. Por lo tanto, la reducción del daño por reperusión, es el objetivo de múltiples estudios para mejorar la prognosis del paciente tras un evento de IAM.

El daño por reperusión es consecuencia de múltiples mecanismos que se activan tanto en el interior de la célula, como en el exterior de la misma [5]. Fisiológicamente, el daño se traduce en disfunciones del endotelio, del sistema vascular, del metabolismo y de la contracción; en la descompensación en el flujo de sangre y en fenómenos de muerte celular, como la necrosis y apoptosis.

En este sentido, se sabe que la mitocondria es particularmente sensible a sobrecarga de calcio y al incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno

que aumentan durante la reperfusión. La disfunción mitocondrial es considerada el “punto sin retorno” en la muerte celular del miocardio. Un elemento clave en esta condición, es el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm) [6, 7]. Su apertura causa la pérdida de la impermeabilidad mitocondrial a iones y sustratos, que se traduce en un colapso del potencial de membrana, en el desacoplamiento de la cadena respiratoria y que favorece la salida de factores pro-apoptóticos hacia el citosol [8,9].

Post-acondicionamiento cardiaco.

En los últimos veinte años se ha reportado la utilización de múltiples compuestos, que son capaces de disminuir en diferente medida, el daño por reperfusión en modelos animales [10, 11, 12]. Sin embargo, los intentos por reproducir estos resultados en la clínica han sido, en la mayoría de los casos, desalentadores.

Recientemente, se describió una nueva estrategia para evitar el daño por reperfusión, basada en la demostración de que el corazón puede “acondicionarse” de manera endógena, mediante la aplicación de episodios breves de anoxia-normoxia, antes de re-establecer la reperfusión prolongada [13]. Estos episodios intermitentes de isquemia-reperfusión (hipoxia-normoxia) son ahora conocidos como post-acondicionamiento (Figura 2).

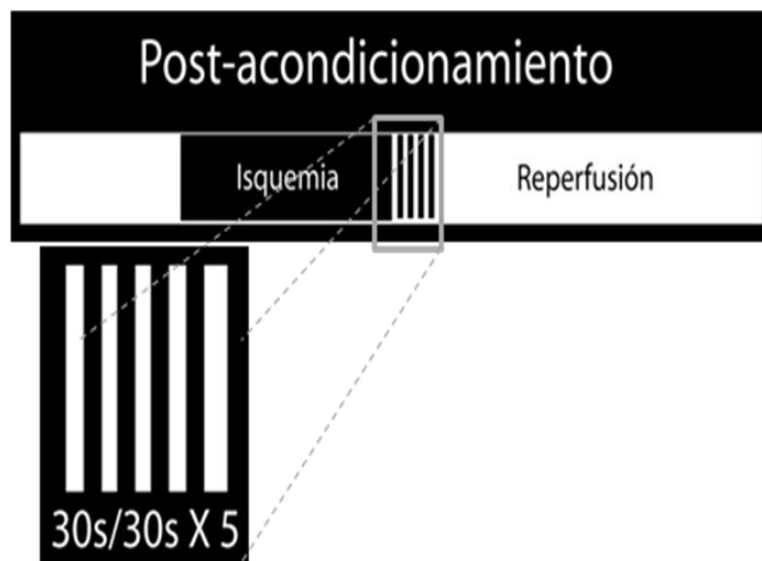


Figura 2. Esquema del protocolo de post-acondicionamiento. Los bloques en color blanco indican el tiempo en que el corazón recibe oxígeno y nutrientes. En negro se representa el tiempo en que el corazón se encuentra en estado de hipoxia (Isquemia). En el recuadro aumentado se muestran los ciclos de post-

acondicionamiento: 5 ciclos alternados de hipoxia-normoxia de 30 segundos cada uno, aplicados antes de la reperfusión prolongada en un modelo de rata.

Mecanismos celulares activados durante el post-acondicionamiento.

Desde que este procedimiento se describió, se han estudiado intensamente los eventos que se relacionan con la recuperación de la función cardíaca y su aplicación. Se ha podido comprobar por ejemplo, que el tamaño del infarto y el daño endotelial disminuyen [13] y que la función cardíaca se recupera [13, 14, 15].

La respuesta endógena de protección en el corazón sugiere la participación de diversos mecanismos, entre los que destacan: la regulación en la producción de especies reactivas de oxígeno, la disminución de muerte por apoptosis [16], el mantenimiento de la función mitocondrial y la inhibición de la apertura del PTPm [17].

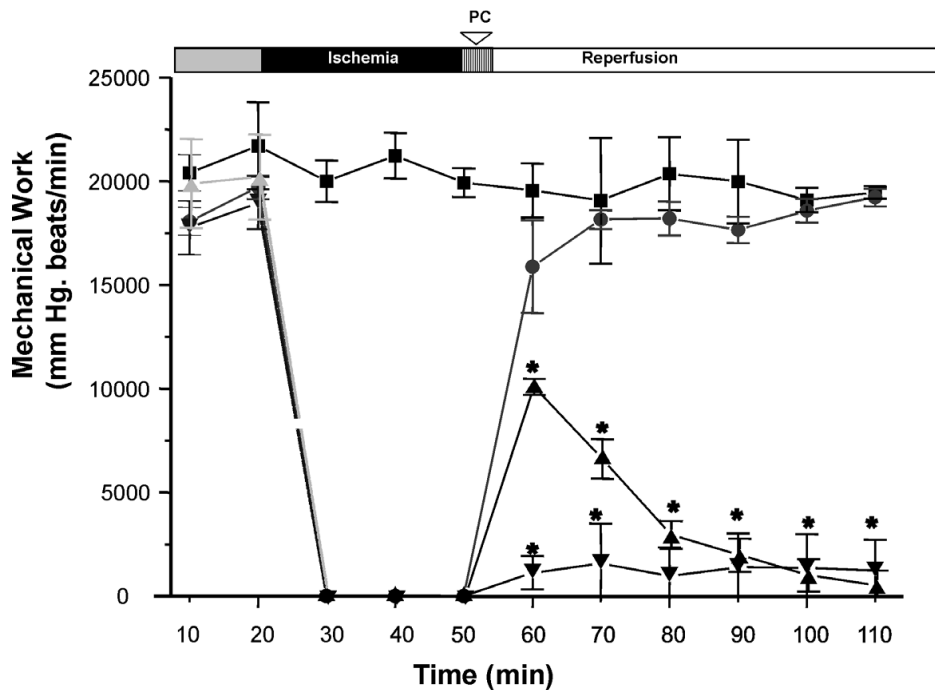


Figura 3. Efecto de la inhibición de la glucólisis sobre la función cardíaca en corazones con post-acondicionamiento. Corazones controles (■); corazones isquémicos-reperfundidos (▼); corazones isquémicos-reperfundidos y post-acondicionados (●); corazones isquémicos-reperfundidos y post-acondicionados + 2-deoxiglucosa (▲). Tomada de la referencia 16.

En este sentido, hemos reportado que el post-acondicionamiento también estimula la glicólisis, como un mecanismo de emergencia en el periodo de transición de

metabolismo anaeróbico a aeróbico, produciendo reservas de energía que el corazón demanda durante la reperfusión temprana. En la figura 3, se observa que el trabajo cardiaco de los corazones isquémicos-reperfundidos se pierde totalmente, en marcado contraste con el trabajo cardiaco de corazones a los que se les aplicó el post-acondicionamiento, tras una isquemia prolongada. Al inhibir la glucólisis con ácido iodoacético o con 2-deoxiglucosa, el efecto protector del post-acondicionamiento se pierde.

Al igual que otros grupos de investigación, hemos demostrado que la aplicación de la maniobra de post-acondicionamiento evita la disfunción mitocondrial [14, 17]. El consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de corazones post-acondicionados es comparable al de las mitocondrias de los corazones controles (Tabla 1); mientras que en las mitocondrias de los corazones isquémicos reperfundidos la capacidad respiratoria se pierde, al igual que su capacidad para acoplar el consumo de oxígeno a la síntesis de ATP. (RC = 3.2 en controles y 3.9 en IR + PC vs 1 en IR₆₀).

	<i>Estado 4 malato/glutamate (ng AO/min/mg)</i>	<i>Estado 3 malato/glutamate (ng AO/min/mg)</i>	<i>RC</i>	<i>Respiración Desacoplada (ng AO/min/mg)</i>	<i>Estado 4 succinato + rotenona (ng AO/min/mg)</i>	<i>Estado 3 succinato + rotenona (ng AO/min/mg)</i>	<i>RC</i>
Control	53.0	169.5	3.2	84.3	15.2	81.3	5.3
I/R	39.6	39.6 más succinato: 51.8	1	41.6	41.6	41.6	1
I/R + PC	56.5	224.7	3.9	108.4	20.3	88.9	4.3

Tabla 1. Consumo de oxígeno en mitocondrias de corazones post-acondicionados. Se muestran los valores de respiración en estado 4, estado 3, el control respiratorio (RC) y la respiración desacoplada con sustratos del Complejo I (malato/glutamato) y II (succinato) de la cadena transportadora de electrones. I/R₆₀: Mitocondrias de corazones isquémicos-reperfundidos; I/R + PC: Mitocondrias de corazones isquémicos-reperfundidos con post-acondicionamiento. Tomada de la referencia 14.

Además, encontramos niveles significativamente mayores de NAD⁺ intramitocondrial en corazones con post-acondicionamiento (I/R + PC), que en los corazones isquémicos-reperfundidos (I/R₆₀), lo que sugiere que se preserva la integridad de las membranas mitocondriales *in situ* (Figura 4). En el recuadro se muestra que la protección conferida por el post-acondicionamiento, es semejante a la que brinda la CSA, inhibidor selectivo del PTPm.

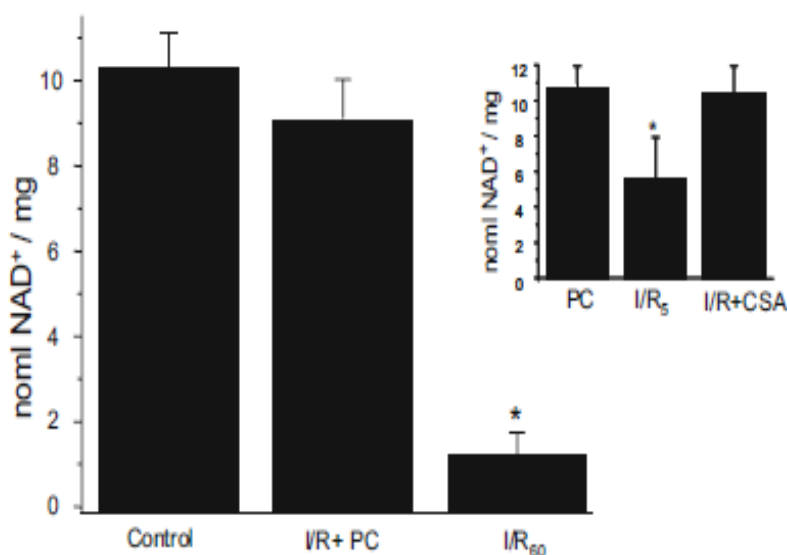


Figura 4. Contenido de NAD⁺ mitocondrial en corazones post-acondicionados. I/R₆₀ (isquemia-reperfusión); PC (post-acondicionamiento); I/R + CSA: corazones tratados con un inhibidor del mPTP (CSA), antes de la isquemia/reperfusión. *P<0.05 vs. control. Tomada de referencia 14.

Cascadas de señalización.

Otros estudios han demostrado que existe una estrecha relación entre la protección miocárdica y la activación de cinasas de sobrevivencia al daño por perfusión RISK, por sus siglas en inglés (*reperfusion injury survival kinase*), como la vía de PI3-K/Akt (*Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt*) y de MEK/ERK1/2 (*mitogen-activated protein kinase kinase/ Extracelular signal-regulated kinase 1/2*) en animales como la rata y el conejo [18, 19]. Se ha observado que PI3-K está ligada a la vía de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y que el óxido nítrico tiene al menos dos blancos principales en mitocondria: los canales de potasio mitocondriales dependientes de ATP (mK_{ATP}) y el PTPm [20]. En este sentido hemos encontrado que la preservación del trabajo cardíaco, la disminución del área infartada, la atenuación de estrés oxidante y la preservación de la función mitocondrial en corazones con co-morbilidad asociada al daño isquémico, está asociada con el incremento en la activación la vía de cinasas MEK1/2-ERK 1/2 en el citosol (datos sin publicar).

Señalización por especies reactivas de oxígeno.

Se sabe que el estrés oxidante es un factor muy importante en la génesis del daño por reperfusión, y por lo tanto se ha sugerido que la reducción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) es determinante para la cardioprotección. En corazones post-acondicionados, se ha observado que las ERO disminuyen, que aumentan las reservas antioxidantes al final de la reperfusión y que esto se relaciona con menor daño oxidante en proteínas y lípidos [14, 21, 22].

Aún cuando la sobreproducción de ERO se asocia con el daño por reperfusión y en general con eventos patológicos, también se ha demostrado que a ciertas concentraciones, pueden ejercer un papel fisiológico activando la señalización y la proliferación celular [23]. Entre las evidencias experimentales que apuntalan el papel de las ERO como moléculas de señalización en el post-acondicionamiento, destacan las del grupo de Penna (2006), quienes demostraron que si se administra el antioxidante N-acetil cisteína (NAC) desde los ciclos de hipoxia-normoxia y durante la reperfusión, se pierde la cardioprotección conferida por el post-acondicionamiento en corazón de ratas [24], pero si la administración del antioxidante se hace justo después de los ciclos de post-acondicionamiento (es decir, sólo durante la reperfusión), la cardioprotección se mantiene. Esto significa que las ERO generadas de “forma controlada” durante los ciclos de hipoxia-normoxia activan vías de señalización, que ayudan a prevenir del estallido oxidante que ocurre durante la reperfusión y que encienden otras vías de protección.

Integración de señales intracelulares en la mitocondria.

Aunque las ERO funcionan como moléculas de protección activando proteínas cinasas como PKC, p38 y/o JAK/STAT principalmente en el citosol [25,26, 27], también se ha descrito que pueden activar a cinasas residentes en mitocondria, como la PKC ϵ [28]. De igual forma, se ha demostrado que la función de componentes mitocondriales puede ser regulada por modificaciones oxidativas y nitrosativas [29]. La participación de estas vías de señalización en cardioprotección se ha demostrado al infundir radicales libres en las arterias coronarias de corazones isquémicos-reperfundidos y bloqueando la protección en corazones post-acondicionados administrando antagonistas para PKC [30].

Como se mencionó, hemos encontrado que la vía de MEK1/2-ERK1/2 responde a los estímulos activados durante el post-acondicionamiento en corazones isquémicos-reperfundidos con co-morbilidad asociada. Actualmente estudiamos sus posibles blancos intracelulares. Utilizando un modelo de isquemia/reperfusión *in vivo*, hemos encontrado que la inhibición selectiva de esta vía de señalización, tiene efecto sobre la función mitocondrial y sobre el estado de fosforilación de sus proteínas (Datos sin publicar).

Integración de señales intracelulares en el núcleo.

Otras vías de respuesta a ERO que pudieran estar relacionadas con el post-acondicionamiento, son aquellas integradas a nivel transcripcional, En particular el factor de transcripción Nrf2-ARE (nuclear factor E2-related factor 2/Antioxidant Response Element), regula la expresión inducible y constitutiva de numerosos genes cuyas proteínas se encuentran involucradas en la detoxificación y eliminación de reactivos oxidantes y electrofílicos. La exposición a estrés oxidante o electrofílico provoca la disociación de Nrf2 de su proteína represora Keap1, rescatando así a Nrf2 de la degradación proteosomal y favoreciendo su acumulación en el núcleo [31]. Otro de los mecanismos propuestos para explicar la disociación de Nrf2 de Keap1 involucra proteínas secundarias que actúan como sensores y que activan vías de señalización de proteínas cinasas que al fosforilar a Nrf2, aumentan su estabilidad y lo liberan de su represor Keap1. Existen evidencias de que algunas cinasas citosólicas, incluyendo a PKC [32], PI3-K [33] y MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) [34], podrían fosforilar a Nrf2. Sin embargo, en corazones post-acondicionados no se ha estudiado la comunicación entre ambas vías y tampoco se sabe si la vía de MEK1/2-ERK1/2 podría activar a este factor.

Conclusión

En los últimos años se ha logrado un gran avance en el conocimiento de las señales cardiacas de transducción que producen protección contra el daño por isquemia/reperfusión y del papel que la mitocondria juega en estos procesos. Sin embargo, se requiere profundizar en estos temas para entender qué mecanismos controlan la decisión final que llevará a la supervivencia o muerte celular.

REFERENCIAS

1. INEGI, Estadísticas de mortalidad en México. 2010. México.
2. Ramzy, I. S., O'Sullivan, C. A., Lam, Y. Y., Dancy, M., Tei, C. & Henein, M. Y. (2009) *Int. J. Cardiol.* **136** (3), 294-9.
3. Kloner, R., Ganote, C. & Jennings, R. (1974) *J. Clin. Invest.* **54**, 1496-1508.
4. Yellon, D. & Hausenloy, D. (2007) *N. Engl. J. Med.* **357**, 1121-1135.
5. Correa, E., Martínez-Abundis, E., Hernández-Reséndiz, S., García, N., Buelna-Chontal, M., Arreguín, F. & Zazueta, C. (2010) *Current Med Chem* **17**, 2261-2273.
6. Arteaga, D., Odor, O., Lopez, R., Contreras, G., Aranda, A. & Chávez, E. (1992) *Life Sci*, **51**, 1127-1134.
7. Griffiths, E. J. & Halestrap, A. P. (1993) *J. Mol. Cell Cardiol.* **25**: 1461-9.
8. Correa, F., Soto, V. and Zazueta, C. *Int. J. Mol. Cell.* (2007) *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **39**, 787-798.
9. Martínez-Abundis, E., Correa, F., Pavón, N., & Zazueta, C. (2009) *FEBS J.* **276**, 5579-5588.
10. Parra, E., Cruz, D., García, G., Zazueta, C., Correa, F., García, N. & Chávez, E. (2005) *Mol. Cell. Biochem.* **269**, 19-26.
11. García-Rivas, G. J., Guerrero-Hernández, A., Guerrero-Serna, G., Rodríguez-Zavala, J.S. & Zazueta, C (2005) *FEBS J.* **272**, 3477-3488.
12. García-Rivas, G. J., Carvajal, K., Correa, F. & Zazueta, C. (2006) *Brith J Pharmacol* **149**, 829-837.
13. Zhao, Z, Corvera, J., Halkos, M., Kerendi, F., Wang, N., Guyton, R. & Vinten-Johansen (2003), *J. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H579–H588.
14. Correa F., García, N., Robles, C., Martínez-Abundis, E. & Zazueta, C. (2008) *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 599-606.
15. Dong, S., Teng, Z., Lu, F. H., Zhao, Y. J., Li, H., Ren, H., Chen, H., Pan, Z. W., Lv, Y. J., Yang, B. F., Tian, Y., Xu, C. Q., & Zhang, W. H. (2010) *Mol. Cell Biochem.* **341**, 195-206.
16. Correa, F., García, N., Gallardo, J.C., Carreño, L., Rodríguez-Enríquez, S., Marín, A. & Zazueta, C. (2008) *Cell. Physiol. & Biochem.* **22**, 635-644.
17. Lim, S., Davidson, S, Hausenloy, D. & Yellon, D. (2007) *Cardiovasc. Res.* **75**, 530-535.
18. Yang, X.M., Proctor, J.B., Cui, L., Krieg, T., Downey, J.M. & Cohen, M.V. (2004) *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 1103-1110.
19. Tsang, A., Hausenloy, D.J., Mocanu, M.M. & Yellon, D.M. (2004) *Circ Res.* **95**, 230-2.
20. Vinten-Johansen, J., Jiang, R., Reeves, J. G., Mykytenko, J., Deneve, J. & Jobe L. J. (2007) *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **21**, 123-145.
21. Sun, H. Y., Wang, N. P., Kerendi, F., Halkos, M., Kin, H., Guyton, R. A., Vinten-Johansen, J. and Zhao, Z.Q. (2005) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H1900-1908.
22. Serviddio, G., Di Venosa, N., Federici, A., D'Agostino, D., Rollo, T., Prigigallo, F., Altomare, E., Fiore, T. and Vendemiale, G. (2005) *FASEB J.* **19**, 354-61.
23. Halliwell, B and Gutteridge, J. M. (1985) *Mol. Aspects Med.* **8**, 89-193.
24. Penna, C., Rastaldo, R., Mancardi, D., Raimondo, S., Cappello, S., Gattullo, D., Losano, G. & Pagliaro, P. (2006) *Basic Res. Cardiol.* **101**, 180-189.

-
25. Pain, T, Yang, X. M, Critz S. D., Yue, Y., Nakano, A., Liu G. S., Heusch, G., Cohen, M. V. & Downey, J.M. *Circ Res* 2000; **87**, 460-466.
 26. Das, D. K., Maulik, N., Sato, M., Ray, P.S. (1999) *Mol Cell Biochem*; **196**, 59-67.
 27. Yue, Y., Qin, Q., Cohen, M. V., Downey J. M., Critz, S. D. (2002) *Cardiovasc Res*; **55**, 681-689.
 28. Costa, A. D., Pierre, S. V., Cohen, M. V., Downey, J. M. & Garlid K. D. (2008) *Cardiovasc Res*, **77**, 344-352.
 29. Pagliaro, P., Moro, F., Tullio, F., Perrelli, M. G. & Penna C. (2011) *Antioxid Redox Signal*; **14**, 833-850.
 30. Cohen, M. V. and Downey, J. M. (2011) *Antioxid Redox Signal* **14**, 821-831.
 31. Dinkova-Kostova, A.T., Liby, K.T., Stephenson, K.K., Holtzclaw, W.D., Gao, X., Suh, N., Williams, C., Risingsong, R., Honda, T. & Gribble, G.W. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; **102**, 4584–589.
 32. Huang, H.C., Nguyen, T. & Pickett, C.B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 42769–74.
 33. Yang, X. M., Proctor, J. B., Cui, L., Krieg, T., Downey, J. M. & Cohen, M. V. (2004) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **44**, 1103-1110.
 34. Yu, R., Chen, C. & Mo, Y. (2000) *J Biol Chem.*; **275**, 39907-39913.

Semblanza de la Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizabal



Licenciada en Biología en 1985, por la Universidad Nacional Autónoma de México (Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza). Cursó estudios de Maestría en Biología Celular en la Facultad de Ciencias, UNAM de 1996 a 1998 y optó por continuar con el programa de Doctorado directo en la misma facultad, obteniendo el grado en el año 2000. Durante 2002 y 2003 ocupó una posición postdoctoral en el Departamento de Biología de la Universidad de San Diego, California. Ingresó al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez en 1987, donde actualmente es investigadora en Ciencias Médicas “E”.

Es miembro de la Academia Mexicana de Ciencias desde 2007 y del Sistema Nacional de Investigadores desde 1997 (Nivel I, de 1997 a 2007; Nivel II, de 2008 a 2011 y Nivel III a partir de este año). Sus líneas de investigación incluyen el estudio de los mecanismos endógenos de protección y de las señales que los activan en corazones post-isquémicos.

Es autora de 69 publicaciones en revistas especializadas con arbitraje, de capítulos en libros internacionales y de artículos de divulgación. Es tutora acreditada en los programas de posgrado de Ciencias Biomédicas, Ciencias Biológicas y Ciencias Médica, Odontológicas y de la Salud de la Universidad Nacional Autónoma de México. Bajo su dirección se han concluido 5 tesis de licenciatura, una de maestría y tres de doctorado.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVI, 106 – 126, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

ESTRUCTURA Y MECANISMO DE LA NUEVA SUBUNIDAD INHIBITORIA ζ DEL NANOMOTOR F_1F_0 ATP SINTASA DE LAS α -PROTEOBACTERIAS EN *Paracoccus denitrificans*

STRUCTURE AND MECHANISM OF THE NEW INHIBITORY SUBUNIT ζ OF ATP SYNTHASE F_1F_0 OF NANOMOTOR IN α -PROTEOBACTERIA *Paracoccus denitrificans*

José J. García Trejo, Mariel Zarco Zavala y Edgar Morales Ríos

Laboratorio 117, Edificio F, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. Circuito Escolar, s/n, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, C.P. 04510. México, D.F. Teléfono/Fax: 56223499

jjgarte@unam.mx

Resumen.

La F_1F_0 ATP sintasa es el nanomotor biológico ubicuo que produce la mayoría de la energía química que impulsa la vida en todas sus formas al sintetizar al ATP a partir del ADP y del Pi. Se trata del nanomotor molecular más pequeño y más eficiente en toda la naturaleza. Su estructura se divide en una parte giratoria o rotor y una parte relativamente estática o estator. Este último está compuesto por las tres interfases α/β catalíticas localizadas en la parte hidrosoluble o F_1 -ATPasa además de un cuello lateral que la ancla a la parte fija del canal de protones transmembranal (F_0). Por otro lado, el cuello central del nanomotor está conformado principalmente por las subunidades γ y ϵ de la F_1 -ATPasa que giran asociadas al anillo de 8-15 subunidades c de F_0 . Este anillo c_{8-15} funciona como una rueda hidrodinámica giratoria impulsada por la corriente de protones a través de la membrana. El giro del anillo c_{8-15} se transmite hasta los sitios

catalíticos de la F_1 a través del cuello central formado por las subunidades γ/ε que conectan a la F_1 con el F_0 . Al girar en contra de las manecillas del reloj (visto de F_0 a F_1), la subunidad γ funciona como el árbol de levas de un motor e induce simultáneamente la unión de sustratos (ADP y Pi), la catálisis y la liberación de productos (ATP) en las tres interfases catalíticas α/β . El giro del nano-rotor es impulsado por el gradiente electroquímico de protones a través de las membranas transductoras de energía de las bacterias, mitocondrias y cloroplastos. Sin embargo, cuando este gradiente de protones disminuye en condiciones anaeróbicas en bacterias y mitocondrias, o en la oscuridad en cloroplastos, el nanomotor tiende a girar en sentido inverso al de la síntesis del ATP para hidrolizarlo. A lo largo de la evolución biológica, se han integrado algunas subunidades o dominios regulatorios a la estructura básica del complejo F_1F_0 para inhibir la hidrólisis del ATP catalizada por este nanomotor. Estas subunidades regulatorias son la subunidad ε en eubacterias, la proteína inhibidora o IF_1 en mitocondrias, y un puente disulfuro en la subunidad γ del rotor central de la enzima de cloroplastos. Estas subunidades regulatorias tienen en común que controlan el giro del rotor central de la enzima además de interactuar con las interfases catalíticas (α/β). En estudios recientes de nuestro grupo, descubrimos una nueva subunidad inhibitoria de 11 kDa en la ATP sintasa de la α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans* completamente diferente a las ya descritas anteriormente. Esta nueva subunidad la denominamos “ ζ ” dado su menor peso y posición electroforética debajo de ε y resultó ser un potente inhibidor de la F_1 -ATPasa de *P. denitrificans*. Esta nueva subunidad ζ la encontramos en todas las α -proteobacterias y es diferente en estructura primaria y terciaria a las subunidades inhibitorias ε e IF_1 de eubacterias y mitocondrias, respectivamente. En resumen, la subunidad ζ de la ATP sintasa de α -proteobacterias es un mecanismo totalmente nuevo de control del nanomotor bacteriano F_1F_0 que involucra el control del giro del rotor, de manera similar a los otros inhibidores ya descritos (ε a IF_1), pero con una estructura completamente diferente. En este trabajo describimos la evidencia bioquímica y estructural que nos ha llevado a descifrar este nuevo y fascinante mecanismo de control del nanomotor F_1F_0 -ATP sintasa de las α -proteobacterias.

Palabras clave: ATP sintasa, nanomotor, rotación, α -proteobacterias, subunidad ζ .

Abstract.

The F_1F_0 ATP synthase is the ubiquitous biological nanomotor that produces most of the chemical energy that drives all forms of life by synthesizing ATP from ADP and Pi. Its structure is divided in a spinning part or rotor, and a relatively static part or stator. The latter is composed by the three catalytic interfaces α/β localized in the soluble F_1 -ATPase part besides a side stalk that anchors F_1 to the static part of the transmembranous F_0 proton channel. On the other hand, the central stalk of the nanomotor is mainly formed by γ and ε subunits of the F_1 -ATPase that spin together with the ring of 8-15 c subunits of F_0 . This c_{8-15} ring works as a hydrodynamic wheel fueled with the proton flow across the membrane. The spin of c_{8-15} ring is transmitted up to the catalytic sites of F_1 through the central stalk formed by the γ/ε subunits that connect F_1 with F_0 . By spinning in the counterclockwise direction (viewed from F_0 to F_1), the γ subunit works as the camshaft of a motor and induces simultaneously substrate (ADP and Pi) binding, catalysis and product (ATP) release at the three

catalytic a/b interfaces. Gyration of the nano-rotor is driven by the electrochemical proton gradient across the energy transducing membranes of bacteria, chloroplasts and mitochondria. However, when this proton gradient diminishes in anaerobic conditions in bacteria and mitochondria, or in the darknes in chloroplasts, the nanomotor is prone to gyrate in the direction opposite to that of ATP synthesis, thus hydrolyzing it. Through biologic evolution, some regulatory subunits or domains have been integrated to the core structure of the F_1F_0 complex to inhibit the hydrolysis of ATP catalyzed by this nanomotor. These regulatory subunits are the ϵ subunit of eubacteria, the inhibitor IF_1 protein of mitochondria, and a disulfide bridge at the γ subunit of the central rotor of the chloroplast enzyme. These regulatory subunits or domains have in common that they control gyration of the central rotor in addition to interact with the catalytic interfaces (α/β). In recent studies from our group we discovered a novel inhibitory subunit of 11 kDa in the ATP synthase of the α -proteobacterium *Paracoccus denitrificans*, which is completely different to those already described. We named this the “ ζ ” subunit since its smaller size and electrophoretic position below ϵ , and resulted a potent inhibitor of the F_1 -ATPase of *P. denitrificans*. This novel ζ subunit was found in all α -proteobacteria and is different in primary, secondary and tertiary structure to the inhibitory subunits ϵ and IF_1 of eubacteria and mitochondria, respectively. In summary, the ζ subunit of the ATP synthase of α -proteobacteria is a totally novel control mechanism of the bacterial F_1F_0 nanomotor that involves the control of the rotor gyration, in a similar fashion to the other inhibitor proteins described (ϵ and IF_1), but with a totally different structure. In this work we describe the biochemical and structural evidence that had taken us to unveil this new and fascinating control mechanism of the F_1F_0 -ATP synthase of α -proteobacteria.

Key words: ATP synthase, nanomotor, rotation, α -proteobacteria, ζ subunit.

Introducción.

La ATP sintasa es el nanomotor ubicuo más pequeño y más eficiente de la naturaleza dado que proporciona energía química para todas las formas de vida al sintetizar la mayoría del ATP a partir de ADP y P_i . Como hemos descrito termodinámicamente con anterioridad [1], dado que la síntesis del ATP es una reacción endergónica, la F_1F_0 ATP sintasa de todos los organismos acopla esta síntesis del ATP en su parte catalítica F_1 al transporte de protones por su canal F_0 impulsado por el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$). Este último es mantenido por las cadenas respiratorias o fotosintéticas de las membranas transductoras de energía como son las membranas internas de las mitocondrias y de los cloroplastos y las membranas plasmáticas de las bacterias (ver Figura 1). En esta figura se puede observar que en condiciones energizadas, es decir durante la respiración mitocondrial o bacteriana, y durante la fase luminosa de la fotofosforilación, las cadenas transportadoras de electrones mantienen un flujo transmembranal de protones que se acumulan en el lado ácido y positivo de la membrana y regresan hacia el lado básico y negativo a través de la F_1F_0 -ATP sintasa. El flujo de los protones a través del canal transmembranal “ F_0 ” de la ATP sintasa impulsa la síntesis del ATP en la parte extramembranal catalítica o “ F_1 ”.

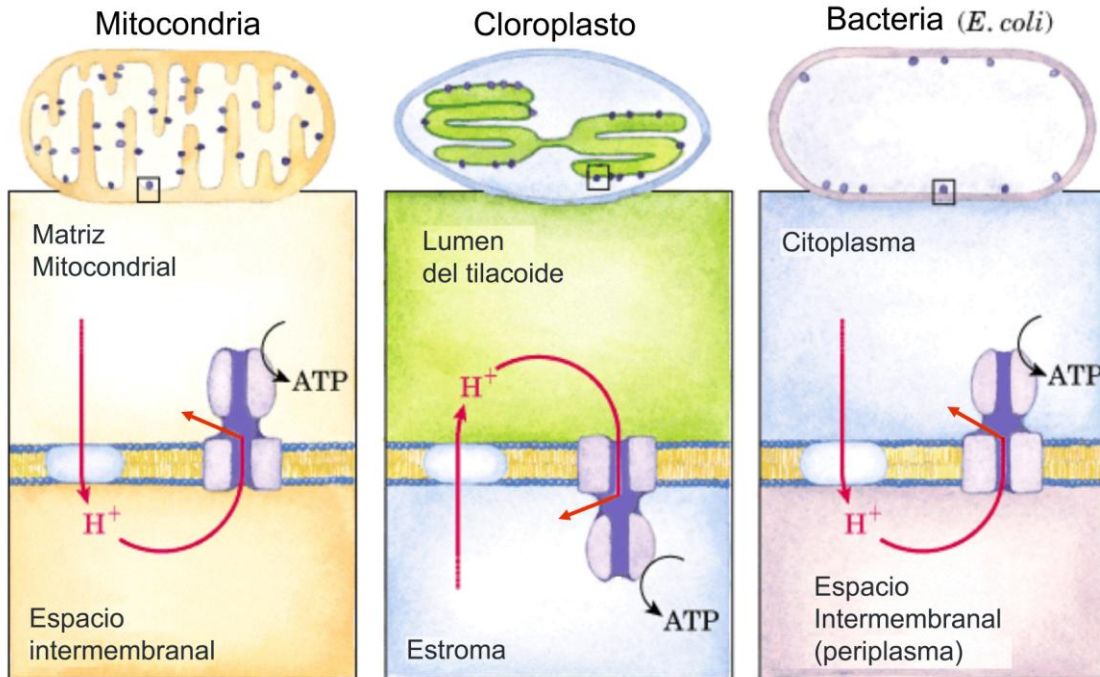


Figura 1. Mecanismo quimiosmótico de la F_1F_0 -ATP sintasa conservado en mitocondrias, cloroplastos y bacterias. En todas las membranas transductoras de energía (membrana interna mitocondrial, membrana tilacoidal de los cloroplastos y membrana plasmática de bacterias) la ATP sintasa funciona de manera similar consumiendo el flujo de protones a través de la membrana impulsado por la cadena respiratoria (mitocondrias y bacterias) o fotosforilante (cloroplastos, bacterias fotosintéticas y cianobacterias). Los protones regresan hacia el lado básico o negativo de estas membranas a través del canal transmembranal (F_0) y esto impulsa la síntesis del ATP en la parte extramembranal catalítica o F_1 . El mecanismo de acoplamiento entre F_1 y F_0 es indirecto dado que los protones no llegan hasta la F_1 , sino que impulsan el giro del cuello o rotor central para promover la síntesis del ATP en la F_1 (ver el texto y figuras en adelante, modificado de Nelson y Cox, (4).

Numerosos estudios funcionales y estructurales han mostrado que el canal de protones F_0 y la parte catalítica F_1 se acoplan estructural y funcionalmente por un mecanismo mecánico ligeramente diferente al de la Figura 1 dado que los protones no atraviesan el centro del canal F_0 , sino que impulsan el giro de un anillo de 8-15 subunidades c (variable entre especies) que funciona como una rueda hidrodinámica giratoria [2]. Este giro se transmite por el cuello central de la enzima donde las subunidades γ y ϵ funcionan como el árbol de levas del motor impulsando la unión de los estratos (ADP y P_i), la síntesis y la liberación del ATP de manera simultánea y alternada en las tres interfases catalíticas (α/β) de la parte F_1 de acuerdo con el mecanismo de cambio de unión de Boyer [3].

Regulación de la rotación intrínseca de enzima para prevenir la actividad de F_1F_0 -ATPasa in vivo.

Como todo motor molecular, el complejo F_1F_0 es reversible, es decir, funciona tanto en el sentido de la síntesis como en el de la hidrólisis del ATP. Cuando el $\Delta\mu_{H^+}$ se colapsa parcial o totalmente se favorece la actividad de F_1F_0 -ATPasa la cual tiende a restablecer el $\Delta\mu_{H^+}$ al bombear protones en el sentido reverso. El colapso del $\Delta\mu_{H^+}$ ocurre por ejemplo durante la anoxia (durante periodos isquémicos en los tejidos de

eucariontes complejos, o en ambientes con bajas presiones parciales de oxígeno en el caso de bacterias o eucariontes simples) o durante la oscuridad en los cloroplastos y bacterias fotosintéticas. Tanto en mitocondrias como en cloroplastos, la actividad de F_1F_0 -ATPasa está bloqueada para prevenir la hidrólisis del ATP por mecanismos diferentes para evitar el daño en la energética y fisiología celular, Sin embargo, un caso diferente es el de las bacterias en donde la actividad de F_1F_0 -ATPasa puede promoverse en condiciones del colapso del gradiente de protones durante la anoxia (ver figura 2). Es el caso de las bacterias facultativas que durante la respiración normal en presencia de oxígeno dado que en estas condiciones la cadena respiratoria provee de gradiente de protones que consume tanto la ATP sintasa como los transportadores secundarios que alimentan a la bacteria (Figura 2A); sin embargo, en condiciones anaerobias donde no hay una cadena respiratoria funcional, el nanomotor F_1F_0 puede revertir el giro del rotor para hidrolizar al ATP proveniente de la glucólisis y así mantener un gradiente de protones con el cual los transportadores secundarios funcionen para alimentar a la célula bacteriana (Figura 2B). Por lo tanto, el caso de la enzima bacteriana adquiere una regulación particular dado que esta regulación debe permitir tanto el giro del rotor del nanomotor en el sentido de la síntesis como en el de la hidrólisis del ATP. El caso de la figura 2 donde el nanomotor F_1F_0 funciona de manera reversible cinética y termodinámicamente puede ocurrir por ejemplo en enterobacterias como *Escherichia coli* en vida libre (condiciones aeróbicas) o en su ciclo de vida dentro del tracto digestivo humano (condiciones anaeróbicas).

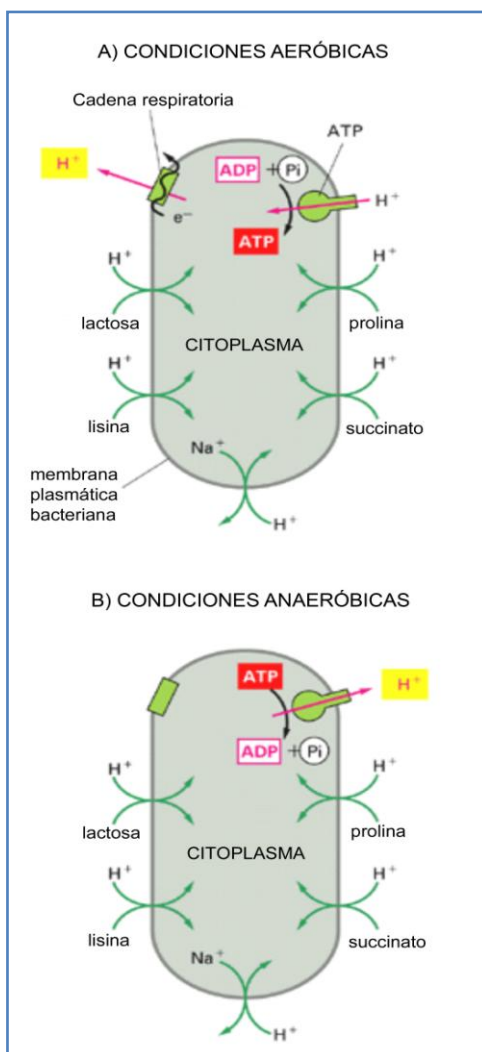


Figura 2. Funcionamiento reversible del nanomotor F_1F_0 bacteriano en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. A) En condiciones aeróbicas la cadena respiratoria bacteriana mantiene un gradiente electroquímico de protones que sostiene la fosforilación oxidativa catalizada por el ingreso de los protones a través de la F_1F_0 -ATP sintasa. Por otro lado, este gradiente mantiene el transporte secundario de nutrientes (azúcares, aminoácidos, iones, etc) importantes para la célula. B) En condiciones anaeróbicas, la ausencia de cadena respiratoria para mantener el gradiente de protones promueve el funcionamiento reverso del nanomotor F_1F_0 como bomba primaria de protones (F_1F_0 -ATPasa), la cual mantiene ahora el gradiente de protones necesario para energizar a los transportadores secundarios de la célula bacteriana.

Anteriormente hemos descrito la evidencia que demostró el funcionamiento de la ATP sintasa como nanomotor [1] de tal manera que ahora nos concentraremos en la estructura y subunidades que forman rotor y el estator de la ATP sintasa para enfocarnos en los mecanismo de regulación. Como se ha mencionado, la estructura del nanomotor se divide en una parte giratoria o rotor, formado principalmente por el anillo c_{8-15} que está conectado a la subunidad γ del cuello central por medio de la subunidad ε también denominada δ en la enzima mitocondrial (Ver Figura 3).

Por lo tanto, la naturaleza ha diseñado o modificado a algunas subunidades de la enzima para inhibir a la actividad de F_1F_0 -ATPasa y permitir o favorecer la de F_1F_0 -ATP sintasa. En general, al disminuir el $\Delta\mu_{H^+}$, algunas subunidades o dominios inhibitorios se estructuran de tal manera dentro del rotor de la enzima que impiden el giro del cuello central impulsado por la unión del ATP (revisado en [5]). En bacterias,

esta función inhibitoria la lleva a cabo la subunidad ε que funciona como un trinquete, es decir, una estructura que favorece el giro del cuello central de la F_1 en el sentido de la síntesis, pero lo inhibe en el de la hidrólisis.

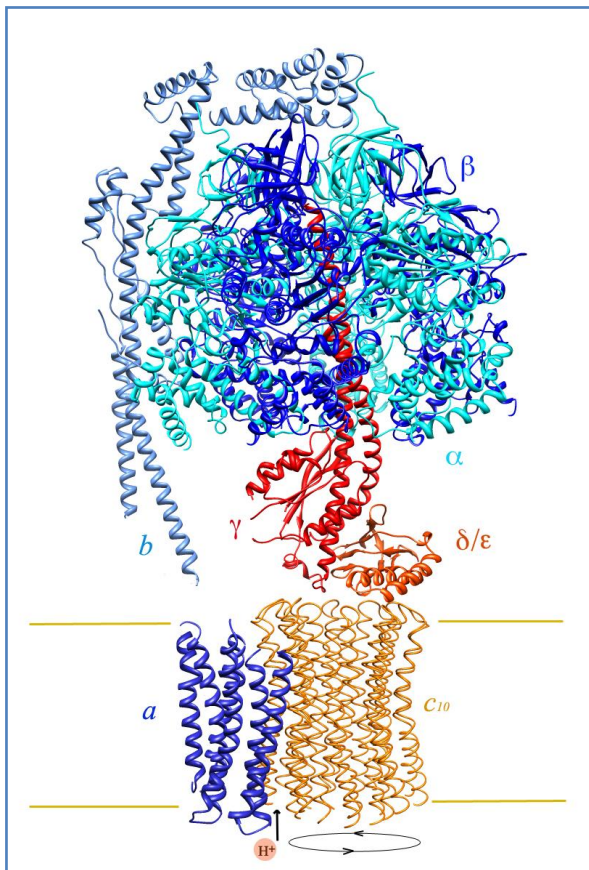


Figura 3. Estructura rotor/estator del nanomotor F_1F_0 . En tonos naranja-rojo se muestran las subunidades del rotor (c_{10} , δ/ε , y γ), mientras que las subunidades del estator se muestran en tonos azules (sub. a de F_0 ; subunidades b , F_6 y $OSCP$ en azul claro; α , cian, y β azul). El paso de los protones por la interfase a/c del canal F_0 promueve el giro del rotor ($c_{10}/\gamma/\delta$) para impulsar la síntesis y liberación del ATP de la parte F_1 . La imagen proviene de un modelo atómico compuesto del monómero de la ATP sintasa insertado en la estructura en 3D resuelto por microscopía electrónica de la ATP sintasa dimerica mitocondrial (6), donde la subunidad δ funciona como el homólogo no inhibitorio de subunidad ε de eubacterias (*E. coli*).

Como se muestra en la Figura 2, en bacterias, la actividad del nanomotor F_1F_0 expresa su reversibilidad cinética y termodinámica en condiciones aeróbicas o anaeróbicas para favorecer la actividad de ATP sintasa o de ATPasa, respectivamente. Esto implica que el giro del rotor central conteniendo a las subunidades $c_{8-15}/\gamma/\varepsilon$ debe revertirse a favor o en contra de las manecillas del reloj (visto de F_0 a F_1) para sintetizar o hidrolizar al ATP, respectivamente (ver Figura 3). En bacterias, la subunidad que regula el sentido de esta rotación, además del anillo c_{8-15} que responden al flujo de los protones, es la subunidad ε que lleva a cabo un gran cambio estructural para favorecer el giro del rotor en el sentido de la síntesis del ATP (ver Figura 4). Se ha demostrado que el dominio inhibitorio de la subunidad ε bacteriana se encuentra en las dos hélices

del extremo C-terminal de la proteína el cual se extiende para contactar a las subunidades del estator (α/β) y del rotor (γ) de la enzima y entonces inhibir el giro del cuello central pero únicamente en el sentido de la hidrólisis del ATP (en el contrasentido de las manecillas del reloj). Por lo tanto, la conformación extendida de la subunidad ε (ε_{Ext}) favorece el giro del rotor del complejo F_1F_0 en el sentido que cataliza la síntesis del ATP, por lo cual se ha propuesto que funciona como un trinquete o “matraca” (Ver Figura 4C). En consecuencia, la conformación compacta de ε (ε_{Com} ver Figuras 3 y 4A) es un confórmero no inhibitorio, en la cual el dominio C-terminal se dobla en una trenza antiparalela de dos α -hélices para interactuar con el dominio N-terminal no-inhibitorio y con la subunidad γ . En esta forma ε_{Com} el rotor puede girar libremente tanto en el sentido de la hidrólisis como en el de la síntesis del ATP (Ver Figura 3 y 4A). Casualmente la enzima que se muestra en la figura 4A es de la F_1 de la bacteria termofílica *Bacillus sp.* TA2.A1 que es inactiva debido a una interacción irregular de la subunidad γ con las subunidades α/β que bloquea el rotor con un mecanismo independiente a ε [7]. La transición de ε_{Com} a ε_{Ext} debe pasar por una forma intermedia semi-extendida (ε_{Sex}) similar a la que se muestra en la figura 4B, en donde las dos α -hélices N-terminales de ε se extienden parcialmente hasta alcanzar a los dominios C-terminales de α y β . Esta estructura ε_{Sex} se encontró tanto en la F_1 -ATPasa de *E. coli* ([8]; figura 4B) como en el complejo γ/ε de *E. coli* cristalizados (9) indicando que debe ser un intermediario real en la transición de ε_{Com} (Figura 4A) a ε_{Ext} (Figura 4C). Esto datos estructurales muestran que al extenderse al máximo, ε enreda sus dos α -hélices N-terminal con la subunidad γ dentro del rotor central para bloquear el giro del rotor de la F_1 -ATPasa (Figura 4C). Además se ha observado que la forma ε_{Com} se estabiliza uniendo un ATP entre sus dominios C- y N-terminales, sugiriendo que esta subunidad funciona como un sensor de ATP que promueve su hidrólisis cuando se acumula ATP en la célula bacteriana [10] y probablemente en condiciones anaeróbicas como se indica en la figura 2B.

Por otro lado, una de las preguntas importantes en cuanto a la evolución de los sistemas de regulación de la ATP sintasa, es cómo ha sido la transición evolutiva de las subunidades inhibitorias desde bacterias hasta mitocondrias, dado que a diferencia de la subunidad ε de la ATP sintasa bacteriana, otra subunidad diferente o proteína inhibidora (IF_1) impide la actividad de la F_1F_0 -ATPasa durante el colapso del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$.

La IF_1 está presente como subunidad regulatoria de la ATP sintasa mitocondrial desde levaduras hasta eucariontes complejos. Este inhibidor ha sido ampliamente estudiado, es una subunidad de 10 kDa se une a la F_1 con una estequiometría de 1:1 a distancia de entrecruzamiento del dominio C-terminal de la subunidad β y también con la subunidad α de la F_1 (revisado en (5)). Esto sugirió por muchos años que el mecanismo de acción de esta proteína era el de bloquear los cambios conformacionales de la subunidad β que son necesarios para la catálisis, uniéndose a través de su dominio N-terminal inhibitorio en alguna interfase α/β [11]. Sin embargo, nosotros reportamos la primera evidencia de que la IF_1 interfiere con la rotación del cuello central del nanomotor dado que encontramos que la IF_1 entrecruza a una distancia $\leq 12\text{\AA}$ con las subunidades del rotor γ y ε tanto en la F_1 soluble como en la F_1F_0 -ATP sintasa completa [12]. Esto lo confirmó posteriormente el grupo del premio Nobel Sir. John E. Walker al observar que el dominio N-terminal de la IF_1 interactúa

directamente con la subunidad γ en el cuello central del complejo F_1 -I de bovino en su estructura cristalina [13].

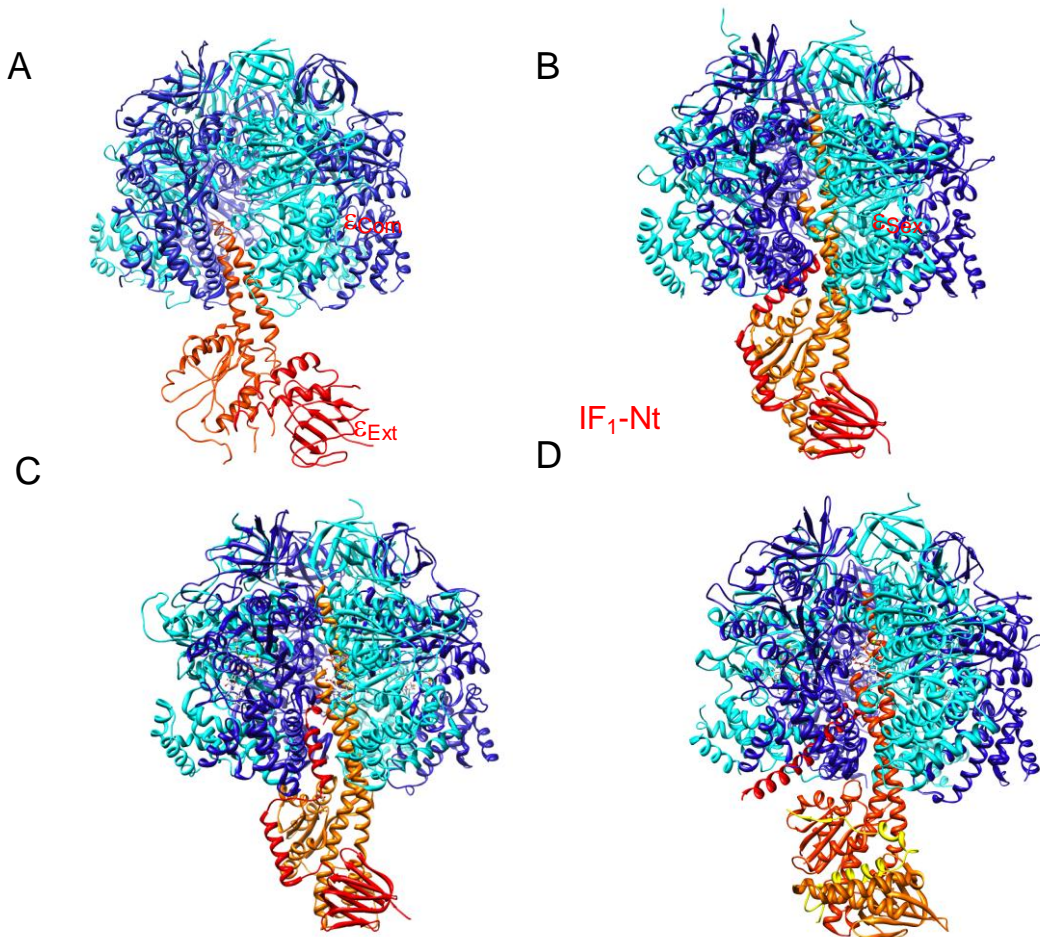


Figura 4. Mecanismos de control de la rotación del cuello central de la F_1 -ATPasa en bacterias y mitocondrias. A) Conformación cerrada o compacta de la subunidad ϵ bacteriana (ϵ_{Com} , rojo) donde se muestran sus dos α -hélices N-terminales compactadas interactuando con el dominio N-terminal de la misma subunidad y con la subunidad γ en naranja (Enzima cristalizada de la bacteria termofílica *Bacillus* sp. TA2.A1; PDB: 2QE7). B) Conformación semi-extendida de la subunidad ϵ (ϵ_{Sex}) donde las dos α -hélices inhibitorias del extremo N-terminal de ϵ se extienden parcialmente para interactuar con los extremos C-terminales de las subunidades α y β en cian y azul, respectivamente. (Enzima cristalizada de *Escherichia coli*; PDB: 1JNV). C) Estructura extendida de la subunidad ϵ (ϵ_{Ext}), las dos α -hélices de ϵ se extienden para enredarse con la subunidad γ del rotor central (naranja). Esta estructura corresponde a la conformación inactiva de la F_1 -ATPasa eubacteriana de *E. coli* (PDB: 3OAA). D) Estructura inactiva de la F_1 -ATPasa mitocondrial de corazón de bovino donde el dominio N-terminal inhibitorio de la proteína inhibitoria (IF_1 -Nt, residuos 1-60, en rojo), se insertan en una interfase α/β e interactúa con la subunidad γ del rotor central para bloquear la rotación del cuello central de la enzima (PDB: 2V7Q).

La estructura primaria, secundaria y terciaria de la IF_1 es muy diferente a la subunidad ϵ bacteriana, dado que no contiene estructura β -plegada sino que es, en su forma aislada una sola α -hélice muy larga cuyo dominio N-terminal inhibitorio se inserta

entre las subunidades α y β para contactar a la subunidad γ y así inhibir la rotación del cuello central y los cambios conformacionales de las interfases catalíticas α/β ([13]; Ver Figura 4D). En esencia, el mecanismo de inhibición tanto de la IF_1 como de ε son similares en cuanto a que ambas proteínas interaccionan con la subunidad γ para inhibir la rotación del cuello central, sin embargo, lo hacen de manera diferente dado que la IF_1 tiene una mayor superficie de contacto con las interfase α/β donde se inserta y contacta a γ con algunos residuos de su extremo N-terminal (Figura 4D), mientras que la subunidad ε tiene mayor contacto con la subunidad γ dado que sus dos α -hélices N-terminales literalmente se enredan con la subunidad γ (Figura 4C).

Evolución de las subunidades regulatorias del nanomotor F_1F_0

Para tratar de resolver cómo ha sido esta transición en el control de la ATP sintasa en la evolución biológica, hemos estudiado la cinética y estructura de la ATP sintasa de la α -proteobacteria *Paracoccus denitrificans*, la cual está relacionada filogenéticamente con el protoendosimbionte que dio origen a las actuales mitocondrias [14, 15]. *P. denitrificans* se ha utilizado como modelo para aislar y estudiar a los demás complejos respiratorios debido a su relativa simplicidad en composición de subunidades comparado con los complejos mitocondriales. Además, la ATP sintasa de *P. denitrificans* tiene la peculiaridad de ser la ATP sintasa más rápida que se ha descrito, y la ATPasa más lenta o latente, esto se refleja en su cociente de actividades ATP sintasa/ATPasa que es de 20-60 [16-18], mientras que el mismo cociente de las enzimas de eubacteria o de mitocondria (o cloroplasto) es menor o cercano a la unidad; es decir, el resto de las ATP sintasas sintetizan o hidrolizan al ATP a una velocidad similar mientras que la enzima de *P. denitrificans* es prácticamente una ATP sintasa unidireccional. Otro caso similar es la ATP sintasa de la bacteria termofílica *Bacillus sp.* TA2.A1 (Figura 4A), la cual también tiene una actividad hidrolítica muy baja y una velocidad sintética muy alta, sin embargo, la actividad sintética de *P. denitrificans* en al menos 10 veces más alta que la de *Bacillus sp.* [7]. De manera peculiar, el bloqueo de la actividad de la $TA2F_1$ -ATPasa es independiente a la conformación de ε (Figura 4A), dado que la actividad de F_1 -ATPasa está bloqueada por una interacción iónica fuerte que ancla a la subunidad γ del rotor central en una interfase α/β lo cual la saca del eje central de pseudo simetría de la F_1 -ATPasa (comparar la Figura 4A de $TA2F_1$ con la EcF_1 en 4B,C y la MF_1 en 4D). Esto bloquea la rotación en el sentido de la hidrólisis del ATP, pero de alguna manera permite la rotación en el sentido de la síntesis. Debido a estos antecedentes, nuestro grupo ha estado interesado en resolver el mecanismo de regulación de la ATP sintasa de *P. denitrificans* que le permite sintetizar al ATP a gran velocidad sin hidrolizarlo.

Después de aislar por primera vez a los complejos F_1 y F_1F_0 de *P. denitrificans*, (PdF_1 y PdF_1F_0) descubrimos una sexta subunidad de 11 kDa asociada a la PdF_1 adicional a las 5 subunidades canónicas de las F_1 -ATPasas bacterianas (α , β , γ , δ , y ε). Esta proteína se encontró también asociada al complejo PdF_1F_0 , el cual se purifica con un método diferente al usado para aislar a la PdF_1 ([18] y Figura 5); por lo tanto, esto indicó que esta sexta subunidad de la PdF_1 es una subunidad estructural del complejo PdF_1F_0 .

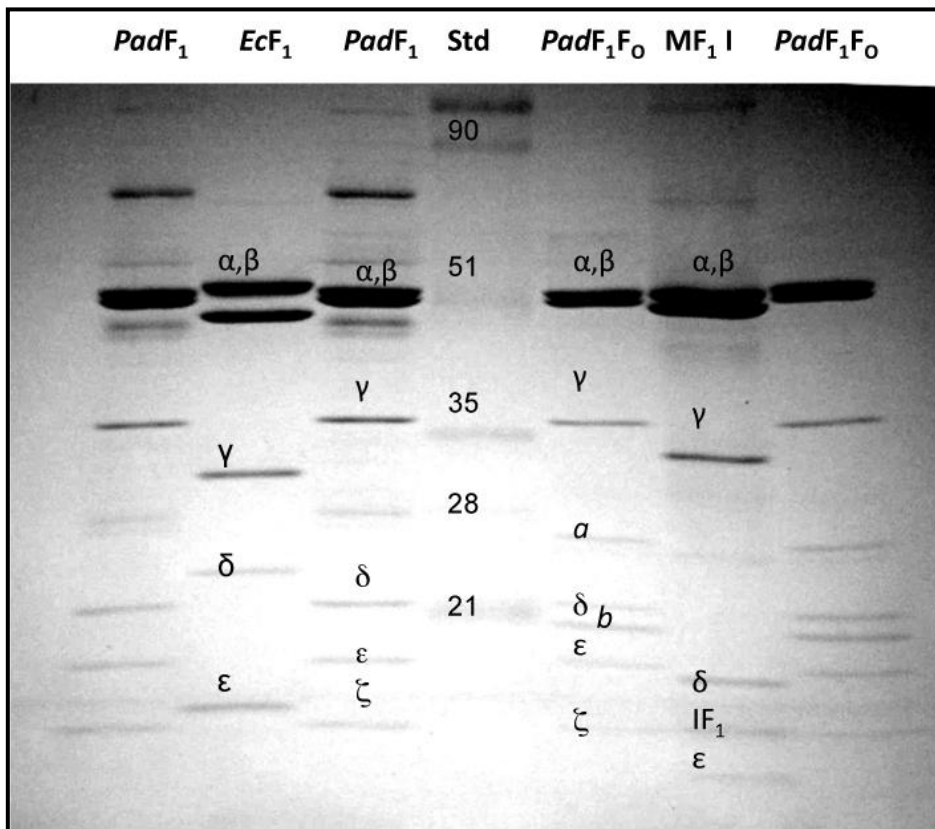


Figura 5. Una nueva proteína inhibidora o subunidad ζ en la ATP sintasa de *P. denitrificans*. Gel desnaturante mostrando a la nueva subunidad ζ en la PdF₁F₀ y PdF₁-ATPasas. Los carriles muestran de izquierda a derecha a la F₁-ATPasa de *Paracoccus denitrificans* (PadF₁), la F₁-ATPasa de *Escherichia coli* (EcF₁), de nuevo la PadF₁ con sus subunidades marcadas, en el carril central estándares de peso molecular (Std), el nanomotor F₁F₀ aislado de *P. denitrificans* (PadF₁F₀), el complejo F₁-IF₁ de corazón de bovino (MF₁I) y finalmente al complejo PadF₁F₀ mostrando que la nueva proteína inhibidora ζ está asociada tanto a la PdF₁ como a la holoenzima de *P. denitrificans* (PadF₁F₀), y co-migra con la IF₁ mitocondrial (comparar PadF₁ y PadF₁F₀ vs MF₁I). El gel separa en forma desnaturante las cinco subunidades canónicas observadas en el resto de las F₁-ATPasas (α , β , γ , δ , y ϵ) y muestra la posición de la subunidad ζ como una sexta subunidad de la PadF₁-ATPasa. Geles similares se han publicado anteriormente por nuestro grupo (Morales-Ríos y cols., 2010 [18]).

Coincidentemente, esta proteína co-migra en geles desnaturantes con la proteína inhibidora (IF₁) de la ATP sintasa mitocondrial (Ver Figura 5: MF₁ vs PadF₁ y PadF₁F₀; referencia [18]). Esta observación junto con el control de la ATP sintasa de *P. denitrificans* que favorece su actividad sintética sobre la hidrolítica, nos llevó a proponer que esta sexta subunidad de la PdF₁ podría ser una proteína inhibidora propia de esta ATP sintasa bacteriana. Dado su peso molecular y migración en geles desnaturantes, denominamos a esta proteína como subunidad ζ en orden decreciente al peso molecular respecto a la subunidad ϵ (Figura 5). Después de clonarla, sobre-expresarla en *E. coli* y purificar a la proteína recombinante, ensayamos el efecto de esta proteína en la actividad de ATPasa de la PdF₁F₀ ATPasa de partículas sub-bacterianas (PSB, vesículas invertidas de la membrana plasmática

donde la parte catalítica F_1 queda expuesta al medio acuoso), y también en la PdF_1 -ATPasa soluble. De acuerdo a nuestra hipótesis regulatoria para esta subunidad ζ , corroboramos que esta proteína es un potente inhibidor de las actividades de PdF_1 -ATPasa y PdF_1F_0 -ATPasa de la enzima de *P. denitrificans* incluso en condiciones de activación en presencia del oxianión sulfito (ver figura 6 y referencia [18]).

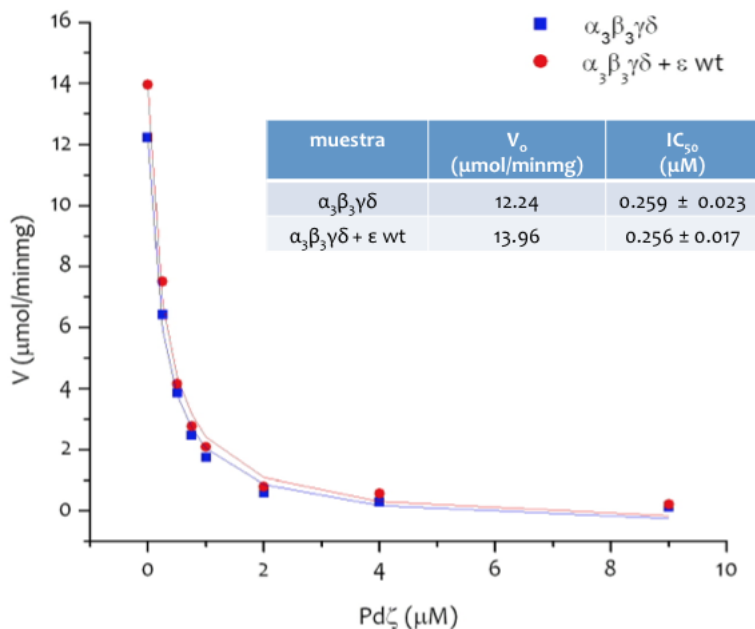


Figura 6. Inhibición de la actividad de ATPasa ejercida por la subunidad ζ en la PdF_1 -ATPasa. Curso temporal de actividad de PdF_1 ATPasa. Se reconstituyó a la subunidad ζ recombinante de *P. denitrificans* en la PdF_1 -ATPasa carente de las subunidades endógenas ε y ζ (Complejo $\alpha_3\beta_3\gamma\delta$). Se añadieron las concentraciones indicadas de la subunidad ζ (■) y en un experimento en paralelo un exceso de ε (●) previo a la adición de ζ . La subunidad ε no inhibió la actividad basal de la PdF_1 -ATPasa, sino que la incrementó ligeramente (el punto a la concentración de $\zeta=0$). Concentraciones crecientes de ζ inhibieron a la PdF_1 -ATPasa con una cinética de inhibidor no competitivo total lo cual se verificó por el ajuste no lineal mostrado por las líneas de ajuste. Inserto: Parámetros cinéticos de inhibición obtenidos por el ajuste no-lineal que se muestra. IC_{50} , concentración necesaria para inhibir el 50% la actividad basal de la PdF_1 -ATPasa. V_0 , velocidad inicial de actividad de PdF_1 -ATPasa en ausencia de inhibidor (ζ).

De manera interesante, encontramos también que la subunidad ε no ejerce función inhibitoria en la PdF_1 -ATPasa o en la PdF_1F_0 -ATPasa ([18] y Figura 5), lo cual sugiere fuertemente que en *P. denitrificans* existe un mecanismo de regulación de la ATP sintasa diferente al de la subunidad ε , y que esta última no participa de manera esencial en la inhibición de la PdF_1 -ATPasa. Es entonces muy probable que la subunidad ζ que encontramos represente un mecanismo de control del nanomotor bacteriano totalmente diferente al mecanismo de “matraca” que se ha propuesto para la subunidad ε en eubacterias. De manera relevante, también encontramos que esta proteína existe como marco de lectura abierto en todas las α -proteobacterias además de *P. denitrificans*, y verificamos que la misma subunidad ζ se expresa unida a la ATP sintasa de otra α -proteobacteria como lo es *Rhodobacter sphaeroides* [18]. Esto implica que este nuevo mecanismo de control con la subunidad ζ no es exclusivo de *P. denitrificans* y existe como tal en toda la familia de las α -proteobacterias.

Adicionalmente, secuenciamos tanto al gen como a la proteína correspondiente a la subunidad ζ y encontramos que esta subunidad no tiene similitud significativa con las otras subunidades regulatorias del nanomotor F_1F_0 como lo son ε en eubacterias o la IF_1 mitocondrial, con la excepción del extremo N-terminal de ζ que es similar al dominio inhibitorio de la IF_1 mitocondrial, pero esta última similitud parece ser de baja significancia. Esto sugiere fuertemente que la subunidad ζ de la ATP sintasa de α -proteobacterias no es un predecesor evolutivo de la IF_1 mitocondrial, aunque no descarta del todo esta posibilidad.

Un hallazgo que encontramos por métodos bioinformáticos es que el gen de esta subunidad ζ se encuentra presente como marco de lectura abierto en todas las α -proteobacterias sugiriendo que esta subunidad regulatoria ζ funciona como tal en el nanomotor F_1F_0 de esta familia de bacterias. Para corroborar esto, por medio de geles nativos en doble dimensión desnaturizante combinado con inmuno-detección tipo “Western-Blot” anti subunidad ζ , verificamos que esta subunidad se encuentra asociada a la ATP sintasa de *Rhodobacter sphaeroides*, una α -proteobacteria relativamente cercana a *P. denitrificans* (18). Este resultado corrobora que la subunidad ζ conforma un nuevo mecanismo de regulación del nanomotor F_1F_0 en la familia de las α -proteobacterias. En cuanto a la posición del gen de la subunidad ζ en el genoma de *P. denitrificans*, se encuentra de manera externa a los dos operones que coordinan la expresión de las partes F_1 y F_0 .

En otras α -proteobacterias bacterias rodobacteráceas como *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodospirillum rubrum*, el operón de la ATP sintasa se divide en dos, uno para la F_1 -ATPasa y otro para el canal F_0 . No existen subunidades externas al operón ATP que se asocien al nanomotor F_1F_0 , por lo tanto, la subunidad ζ sería el primer ejemplo de una subunidad regulatoria incorporada al nanomotor como un gen externo a los operones de la ATP sintasa. Existe un par de genes que se encuentran localizados en el operon ATP en todas las bacterias que es el primer gen *I* del operon ATP por ejemplo de *E. coli* (en eubacterias hay un solo operon para todos los genes del nanomotor). Este gen codifica para un factor de ensamblaje de la subunidad *c* del canal de protones F_0 , pero no forma parte del complejo F_1F_0 nativo [19]. Por otro lado, otro gen en *Rhodobacter blasticus* se encuentra en el operon de la enzima pero codifica para proteína llamada majastridina, una aparente glicosiltransferasa que no forma parte funcional ni estructural de la ATP sintasa bacteriana [20]. En resumen la subunidad ζ es el primer gen externo a los operones ATP que se integra estructural y funcionalmente al nanomotor F_1F_0 .

Con la secuencia del gen y de la proteína confirmamos que la subunidad ζ no es una subunidad regulatoria exclusiva de *P. denitrificans*, sino que constituye un nuevo mecanismo del control del nanomotor que se extiende a lo largo de toda la familia de las α -proteobacterias (Ver Figura 7 y Tabla I). Dado que dentro de éstas se encuentran algunas de las más cercanas al protoendosimbionte que dio origen a las actuales mitocondrias, la pregunta que surge es si esta proteína representa un predecesor de la proteína inhibitoria mitocondrial (IF_1) o si es un inhibidor con estructura y mecanismos diferentes.

	EcF₁F₀	CF₁F₀	PdF₁F₀	ScF₁F₀	MF₁F₀
F₁	α_3	α_3	α_3	α_3	α_3
	β_3	β_3	β_3	β_3	β_3
	γ_1	γ_1	γ_1	γ_1	γ_1
	δ_1	δ_1	δ_1	OSCP ₁	OSCP ₁
	ϵ_1	ϵ_1	ϵ_1	δ_1	δ_1
				ϵ_1	ϵ_1
			ζ (11kDa)		
				IF₁	IF₁
F₀	a_1	IV	a_1	a_1 o Sub.6	a_1 o sub 6
	b_2	I,II	b_1	b_1	b_1
	c_{9-12}	III ₉₋₁₂	c_{9-12}	c_{10} o sub 9	c_8 o sub 9
				Sub. 8 (A6L) e, g, i, k	A6L, d, e, f, g, F6

Tabla I. Composición en subunidades integrales del nanomotor F₁F₀-ATP sintasa en diferentes organismos. La tabla muestra el contenido de subunidades de la ATP sintasa nativa aislada de diferentes especies, desde bacterias hasta mitocondrias. Se muestran las 8 subunidades básicas del nanomotor que se conservan desde eubacterias (*E. coli*, EcF₁F₀), es decir las cinco canónicas de la F₁-ATPasa (α , β , γ , δ y ϵ) y las 3 esenciales del canal de protones F₀ (a , b , y c). Las estequiometrías de cada subunidad se muestran como subíndices. La nomenclatura de algunas subunidades cambian en la enzima de cloroplastos (CF₁F₀), de *Saccharomyces cerevisiae* (ScF₁F₀) y la de mitocondrias de corazón de bovino (MF₁F₀). Las subunidades inhibitoras o reguladoras del nanomotor se muestran en negritas con fondo gris. La subunidad ϵ es el regulador del nanomotor tanto en eubacterias como en cloroplastos, mientras que en la enzima de *Paracoccus denitrificans* (PdF₁F₀) y las α -proteobacterias no funciona como tal. La IF₁ es la proteína inhibitora de la enzima mitocondrial desde levaduras hasta eucariontes complejos. La nueva subunidad inhibitora que descubrimos en la ATP sintasa de *P. denitrificans* es un inhibidor con estructura primaria y terciaria completamente diferentes a ϵ y a la IF₁, y represente un mecanismo de control del nanomotor bacteriano completamente novedoso por resolver.

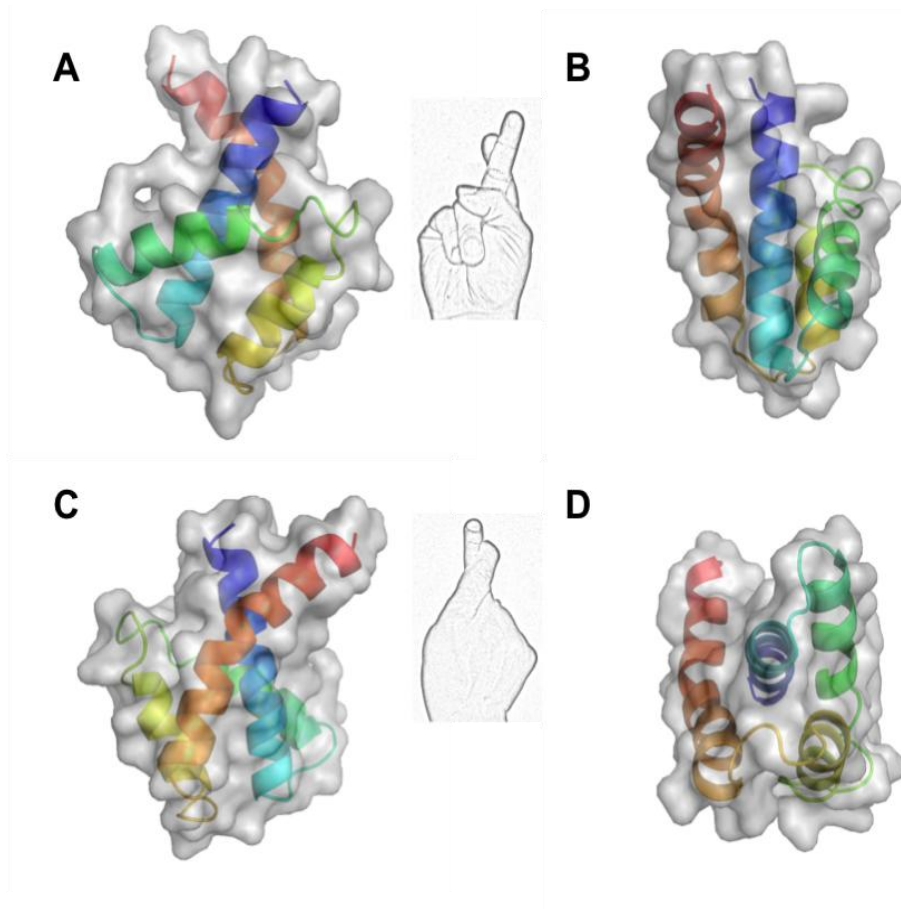


Figura 8. Modelo de la estructura terciaria de la subunidad ζ de la ATP sintasa de *Paracoccus denitrificans*. A partir de la estructura resuelta por RMN de la subunidad ζ de *Jannaschia sp*, se construyó un modelo atómico de la subunidad ζ de *P. denitrificans* por su alta similitud (>70%) con la subunidad de *Jannaschia sp*. La estructura terciaria de la proteína corresponde a una estructura globular con 4 α -hélices con los extremos N y C terminales (azul y rojo respectivamente) entrelazados entre sí en forma antiparalela de manera similar a los dedos índice y medio cruzados en forma inversa. Las α -hélices 1-4 se muestran en un gradiente de colores desde azul, verde, amarillo y rojo, respectivamente. Las hélices están conectadas por tres asas, de las cuales las primeras dos (azul y verde) muestran la mayor movilidad. A) Vista “frontal” de la estructura mostrando a las dos hélices N-T terminales cruzadas en la parte posterior del dominio globular análogo a los dedos en forma inversa en una mano derecha, donde la hélice N-terminal (azul) sería análoga al dedo medio y la hélice C-terminal (rojo) al dedo índice (ver inserto). B) Vista lateral del modelo con el dominio N-T cruzado formando la parte “trasera” de la estructura del lado izquierdo. C) Vista “trasera” de la subunidad ζ mostrando el dominio N-T cruzado como la parte posterior de la mano con los dedos cruzados a la inversa (ver inserto). D) Vista “inferior” del modelo de la subunidad ζ de *P. denitrificans* donde se observa el empaquetado de las 4 hélices en una estructura compacta y globular. El dominio N-T cruzado que está más expuesto forma parte de la región inhibitoria de la proteína de acuerdo a resultados de proteólisis limitada (ver texto y referencia (21)).

Se resolvieron 20 conformeros de la subunidad ζ mostrando una proteína con 100% α -hélice como observamos inicialmente por dicroísmo circular, conteniendo 4 α -hélices dobladas en forma globular y las dos α -hélices de los extremos N y C terminales se aproximan entre sí para formar una dominio que sobresale del dominio globular ([21], Ver Figura 8). La estructura terciaria de la proteína es totalmente

diferente a la subunidad ε de la ATP sintasa de eubacterias y a la proteína inhibidora mitocondrial (IF_1). Experimentos de proteólisis limitada con la subunidad ζ de *P. denitrificans* muestran que el dominio inhibitorio de esta proteína se encuentra en el extremo N-C terminal que sobresale del dominio globular, dado que al remover ambos extremos N y C terminales con tripsina se pierde la capacidad inhibitoria de la subunidad ζ [21]. La estructura preliminar de la subunidad ζ está por publicarse en breve a nivel internacional [21], debido a esto no la podemos publicar en este trabajo, sin embargo, podemos mostrar la estructura de un modelo de la subunidad ζ derivado de la estructura resuelta de la misma subunidad de *Jannaschia sp.* (Ver Figura 8).

La estructura primaria y terciaria de ambas proteínas ζ de *P. denitrificans* y *Jannaschia sp.* es casi idéntica, y muestran el dominio globular de 4 α -hélices, así como el dominio N-C terminal donde los dos extremos de la proteína se entrelazan para formar el probable dominio inhibitorio, de acuerdo a los resultados de proteólisis limitada que hemos encontrado hasta ahora [21].

Comparativamente, la estructura terciaria de la subunidad ζ de *P. denitrificans* es totalmente diferente a las subunidades inhibitorias ε e IF_1 de eubacterias y de mitocondrias, respectivamente. A diferencia de ε eubacteriana, la subunidad ζ carece de estructura β plegada, dado que es una proteína toda α -hélice, pero su doblamiento en forma globular es diferente a la estructura de la IF_1 dado que esta última se extiende como una sola α -hélice alargada (Ver Figura 9C). Por lo tanto, ζ representa una estructura primaria y terciaria totalmente diferente a las subunidades ε e IF_1 . Esto sugiere que ζ no es un predecesor evolutivo directo de la IF_1 , sino que se integró como una proteína regulatoria externa al operón ATP de las α -proteobacterias en substitución por ε , y posterior al evento endosimbiótico mitocondrial, la proteína se perdió como subunidad regulatoria de la ATP sintasa para ser substituida por la IF_1 . A pesar de la diferencia en secuencia y estructura de ζ con la IF_1 , cabe mencionar que un primer segmento del extremo N-terminal de ζ tiene un 35% de identidad con un segmento similar del dominio inhibitorio de la IF_1 [21] de tal modo que no se descarta del todo la posibilidad de que ζ sea un predecesor evolutivo de la IF_1 aunque puede ser un caso de convergencia evolutiva sin que ζ ni la IF_1 estén relacionados filogenéticamente.

Buscando alguna propiedad en común entre los inhibidores ε , ζ , e IF_1 , de las ATP sintasas eubacterianas, α -protobacterianas y mitocondriales, respectivamente, encontramos que los dominios inhibitorios de estas proteínas se localizan ya sea en el extremo C-terminal, como en el caso de ε , o en el extremo N-terminal como en el caso de la IF_1 (ver dominios en rojo en la Figura 9). Estos dominios inhibitorios se insertan en la interfase entre el rotor (α/β) y el estator (γ/ε) de la F_1 -ATPasa para interferir con el giro del nanomotor (ver Figura 4). El caso de ζ podría ser similar, dado que aunque contiene una estructura terciaria completamente diferente a ε y a IF_1 (Figura 9), como mencionamos anteriormente, datos de proteólisis limitada muestran que el segmento inhibitorio de ζ se encuentra en el dominio N-C donde entrecruzan sus extremos N- y C-terminales. Falta discernir cuál de ambos extremos es el inhibitorio, aunque es posible que ambos segmentos contribuyan a la inhibición del nanomotor ejercido por ζ .

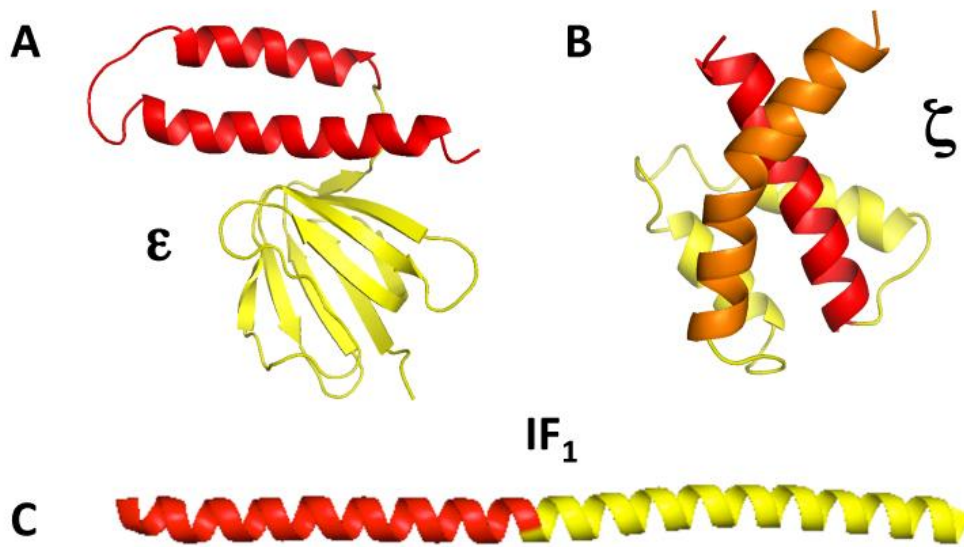


Figura 9. Comparación de las estructuras terciarias de los inhibidores de las F-ATPasas bacterianas y mitocondriales. Se muestran las estructuras de las subunidades recombinantes clonadas, sobre-expresadas y purificadas a partir de sus fuentes originales. A) Estructura en solución (NMR) de la subunidad ϵ de la ATP sintasa de *E. coli* (PDB: 1BSN). B) Modelo inicial de la estructura de la subunidad ζ de *P. denitrificans* a partir de la estructura en solución resuelta por NMR de la misma proteína de *Jannaschia sp.* C) Estructura de la proteína inhibidora de la ATP sintasa mitocondrial de corazón de bovino (IF_1) (PDB:1GMJ). En rojo se muestran los dominios inhibitorios que corresponden al C-terminal de ϵ (A), al dominio N-C cruzado de ζ (B) y al N-terminal de la IF_1 (C). En B), la α -hélice 1 o N-terminal de ζ se muestra en rojo como la más probable de contener el dominio inhibitorio (ver texto), mientras que la α -hélice 4 del C-terminal se muestra en naranja dado que esta hélice puede participar directa o indirectamente en la inhibición que ejerce esta subunidad ζ en la ATP sintasa de las α -proteobacterias.

Finalmente, respecto al sitio de unión de la subunidad ζ endógena en la PdF₁-ATPasa nativa, hemos realizado experimentos de entrecruzamiento químico y de proteólisis limitada de las subunidades ζ y ϵ en la PdF₁-ATPasa para resolver si existe alguna posible interacción entre estas dos subunidades, y para definir algunas de las interacciones cercanas entre la subunidad ζ y el resto de las subunidades de la PdF₁-ATPasa. Este tipo de experimentos los realizamos anteriormente para el complejo F₁-IF₁ nativo aislado de mitocondrias de corazón de bovino y encontramos entrecruzamientos entre las subunidades del estator (α/β) y del rotor (γ/ϵ) de la F₁-ATPasa mitocondrial, siendo la primera evidencia que la IF₁ interfería con la rotación de la subunidad γ del cuello central del nanomotor [12]. En el caso de la PdF₁-ATPasa, los resultados más claros de entrecruzamiento muestran una interacción mayoritaria entre las subunidades α y β con la subunidad ζ .

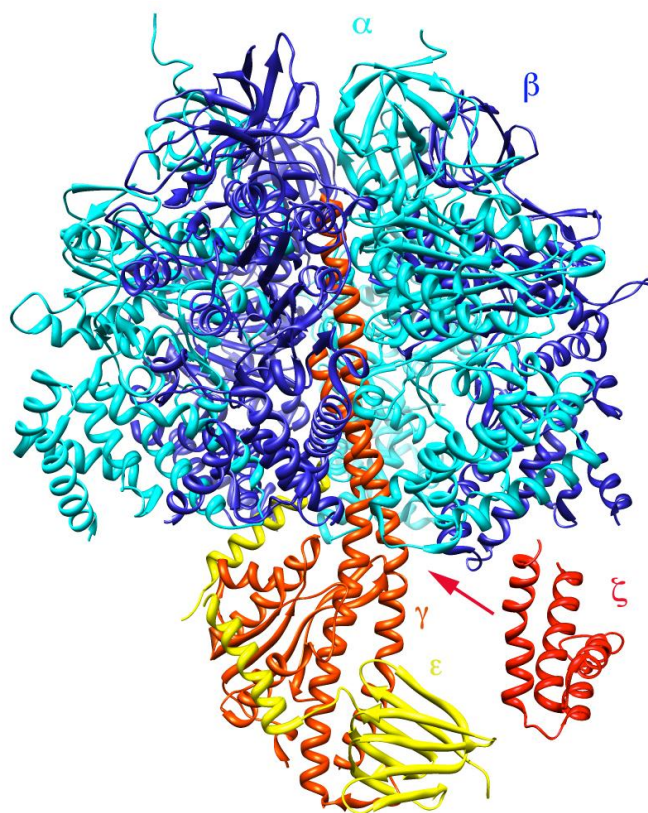


Figura 10. Modelo estructural del posible sitio de unión de la subunidad ζ de *P. denitrificans* en la F_1 -ATPasa bacteriana. La figura muestra a la F_1 -ATPasa de *E. coli* con la conformación semi-extendida de ε dado que los datos de entrecruzamiento de ε en *P. denitrificans* muestran que ε puede entrecruzar con las subunidades α y β de la PdF_1 -ATPasa. El sitio de unión de la subunidad ζ (rojo) se propone en una interfase entre el estator (α/β) y el rotor (γ/ε) del nanomotor donde puede interferir tanto con los cambios conformacionales de una interfase catalítica (α/β) como con el giro del rotor central, bloqueando la catálisis rotacional. Se asume que el dominio inhibitorio N-T se debe orientar como se muestra en la figura para unirse en una interfase o cavidad entre las subunidades $\alpha/\beta/\gamma/\varepsilon$ como se indica por la flecha roja. El modelo final está en vías de refinarse y enviarse a publicación con la estructura completa de ζ resuelta por NMR [21].

En particular con entrecruzadores homobifuncionales reversibles con distancias de entrecruzamiento de 12-14 Å, encontramos un par de entrecruzamientos de bajo rendimiento entre la subunidad ζ y las subunidades γ y ε del rotor de la PdF_1 -ATPasa [21]. Estos resultados sugieren muy fuertemente que de manera similar a la IF_1 mitocondrial, la subunidad ζ interactúa en una interfase α/β con el estator de la PdF_1 -ATPasa, y además también interactúa con la subunidad γ y probablemente con la subunidad ε en la PdF_1 . En conclusión, es muy probable que ζ se una en una interfase entre el estator (α/β) y el rotor (γ/ε) de la enzima interfiriendo directamente con la rotación del cuello central del nanomotor, de manera similar a la IF_1 mitocondrial, y en general también de manera parecida a la subunidad ε eubacteriana, pero con una estructura terciaria diferente a estas otras subunidades regulatorias. Esto se ilustra en la figura 9 donde se posiciona a la subunidad ζ cerca de una interfase $\alpha/\beta/\gamma/\varepsilon$ con el dominio N-T inhibitorio apuntando hacia esta interfase donde muy probablemente se

una para interferir con la rotación de γ y/o los cambios conformacionales de una interfase catalítica α/β . También es posible que ζ funcione como un trinquete (Figura 4A) substituyendo funcionalmente a ε de las eubacterias dado que esta subunidad parece ser no inhibitoria en las α -proteobacterias (Figura 6 y referencia [18]).

Para resolver estas preguntas se necesitan datos estructurales que resuelvan a la mayor resolución posible la posición exacta de la subunidad ζ en la PdF₁-ATPasa nativa. Actualmente, nuestro modelo estructural hipotético de trabajo (Figura 9) lo estamos probando por varios métodos estructurales como son los entrecruzamientos, la mutagénesis dirigida, la proteólisis limitada, a corto o mediano plazo. Finalmente, a largo plazo estamos comenzando la resolución atómica de la PdF₁-ATPasa conteniendo a la subunidad ζ por cristalografía de rayos X en colaboración con el Premio Nobel de Química, el Dr. Sir. John E. Walker (Cambridge, UK). Todo esto para resolver a nivel atómico esta fascinante estructura que abre una nueva línea de investigación en la regulación del nanomotor más eficiente y más importante para toda las formas de vida.

Agradecimientos. Este proyecto se ha sustentado inicialmente por un proyecto de CONACYT (V-43814M) y dos proyectos de la UNAM (DGAPA-PAPIIT, IN213809 e IN211012).

Referencias

1. García-Trejo, J. J., Zarco-Zavala, M. and Morales-Ríos, E. (2011) *Mensaje Bioquímico* **35**, 39-52
2. Noji, H., and Yoshida, M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 1665-1668
3. Boyer, P. D. (1997) *Annu Rev Biochem* **66**, 717-749
4. Nelson, D. L. a. C., Michael M. (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*, Worth Publishers
5. García, J. J., Minauro-Sanmiguel, F., and Bravo, C (ed) (2002) *Mitochondrial ATP synthase: Structure, function, assembly, and a topography model for human subunit 6*, Vol. I, Research Signpost, Trivandrum
6. Couoh-Cardel, S. J., Uribe-Carvajal, S., Wilkens, S., and Garcia-Trejo, J. J. *J Biol Chem* **285**, 36447-36455
7. Stocker, A., Keis, S., Vonck, J., Cook, G. M., and Dimroth, P. (2007) *Structure* **15**, 904-914
8. Hausrath, A. C., Capaldi, R. A., and Matthews, B. W. (2001) *J Biol Chem* **276**, 47227-47232
9. Rodgers, A. J., and Wilce, M. C. (2000) *Nat Struct Biol* **7**, 1051-1054
10. Yagi, H., Kajiwara, N., Tanaka, H., Tsukihara, T., Kato-Yamada, Y., Yoshida, M., and Akutsu, H. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11233-11238
11. Jackson, P. J., and Harris, D. A. (1988) *FEBS Lett* **229**, 224-228
12. Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., and Garcia, J. J. (2002) *J Bioenerg Biomembr* **34**, 433-443
13. Cabezon, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2003) *Nat Struct Biol* **10**, 744-750
14. John, P., and Whatley, F. R. (1975) *Nature* **254**, 495-498
15. Gray, M. W., Burger, G., and Lang, B. F. (1999) *Science* **283**, 1476-1481
16. Perez, J. A., and Ferguson, S. J. (1990) *Biochemistry* **29**, 10503-10518
17. Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (2003) *Biochemistry (Mosc)* **68**, 1101-1108

-
18. Morales-Rios, E., de la Rosa-Morales, F., Mendoza-Hernandez, G., Rodriguez-Zavala, J. S., Celis, H., Zarco-Zavala, M., and Garcia-Trejo, J. J. (2010) *FASEB J* **24**, 599-608
 19. Ozaki, Y., Suzuki, T., Kuruma, Y., Ueda, T., and Yoshida, M. (2008) *Biochem Biophys Res Commun* **367**, 663-666
 20. Enroth, C., and Strid, A. (2008) *Biochim Biophys Acta* **1784**, 379-384
 21. Morales-Rios, E., Zarco-Zavala, M., Serrano-Navarro, P. Wüthrich, K., Mendoza-hernández, G., Ramírez-Silva, L. and García-Trejo. J.J. (2012) *Submitted*.

Semblanza del Dr. José de Jesús García Trejo



El Dr. García Trejo estudió la licenciatura, la maestría y el doctorado en Investigación Biomédica Básica de la UNAM, fue galardonado con la Medalla Gabino Barreda. El campo de estudio del Dr. García Trejo se enfoca en el nano-motor más importante de todas las formas de vida: la F1F0-ATP sintasa.

Este es el nanomotor ubicuo que genera la energía química necesaria para todas las células al sintetizar al ATP, el cual se hidroliza en ADP y fosfato inorgánico (Pi) para impulsar todas las funciones y formas de trabajo celular más vitales, incluyendo la síntesis de macromoléculas (ADN, proteínas, etc.), las diversas formas de movimiento y trabajo mecánico celular, así como el trabajo osmótico y de transporte de nutrientes, iones, etc. Esta línea se derivó de sus estudios de posgrado en los laboratorios de los Dres. Marietta Tuena de Sangri y Armando Gómez-Puyou, ambos investigadores eméritos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El Dr. García Trejo culminó su formación postdoctoral en bioquímica y biología molecular en el laboratorio del Dr. Roderick A. Capaldi, en la Universidad de Oregon, USA, y posteriormente fue repatriado por el CONACYT al Instituto Nacional de Cardiología de México, donde consolidó su trayectoria por 10 años para después re- instalar su actual laboratorio en la Facultad de Química de la UNAM.

El Dr. García Trejo es Investigador Nivel-II del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) del CONACYT; ha publicado mas de 30 artículos internacionales en las mejores revistas y libros de Bioquímica y Biología Molecular en USA y Europa, además de haber editado un libro internacional, y ser árbitro revisor de 5 de estas mismas revistas internacionales. Esto además de dirigir varias tesis de licenciatura, maestría y doctorado de actuales investigadores en bioquímica a nivel nacional e internacional. Las aportaciones más importantes del Dr. García Trejo en el campo de la bioenergética y la estructura, regulación y evolución del la ATP sintasa son las siguientes: la cinética y energética de la fosforilación oxidativa y del mecanismo rotacional del nanomotor F1- ATPasa; la estructura tridimensional y biogénesis de las

mitocondrias al resolver la estructura dimérica en 2D y 3D de la ATP sintasa mitocondrial que le da forma a las crestas mitocondriales; más recientemente en la bioenergética, evolución y microbiología bacteriana al descubrir una novedosa proteína inhibidora o subunidad ζ de la ATP sintasa en las α -proteobacterias. Estas dos últimas líneas lo mantienen en la frontera de su campo y le abrieron importantes colaboraciones internacionales con el Dr. Stephan Wilkens de la SUNY Upstate Medical School de NY, USA, y de manera sobresaliente con dos Premios Nobel de Química, con el Dr. Sir John E. Walker, de Cambridge, UK, y el Dr. Kurt Wüthrich del Scripps Research Institute, de California, USA; esto para descifrar a nivel atómico el nuevo mecanismo de regulación del nanomotor ATP sintasa por la subunidad ζ en las α -proteobacterias. En el ámbito de investigación clínica, el impacto de sus publicaciones abarca la proteómica y genómica de las miopatías mitocondriales y cardiomiopatías humanas, el control de la angiogénesis y el transporte de colesterol. Además de todo esto, el Dr. García Trejo ha mantenido una labor docente continua a nivel licenciatura y posgrado impartiendo cursos de Fisiología Microbiana, Bioquímica y Termodinámica de Proteínas, respectivamente, esto desde sus inicios como estudiante de posgrado de la UNAM hasta la fecha como Profesor Titular del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVI, 127 – 137**, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

LA INFLAMACIÓN COMO UN FACTOR CLAVE PARA DESENCADENAR LA NEURODEGENERACIÓN

INFLAMMATION AS A KEY FACTOR TO TRIGGER THE NEURODEGENERATION

Alfonso Díaz^{1,2,3}, Jorge Guevara², Blanca Espinosa⁴, Raúl Chávez², Daniel Limon¹

¹Lab. de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP. ²Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM ³Lab. Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, INNN-MVS. ⁴Departamento de Bioquímica. INER
dan_alf2005@yahoo.com.mx

Resumen

Un gran número de evidencias han documentado que la inflamación es un mecanismo que podría participar de forma importante en el progreso de la neurodegeneración presente en las enfermedades de Parkinson (EP) y Alzheimer (EA) principalmente. La desregulación y la sobre activación de las células de la glía en el sistema nervioso central ocasionan la síntesis y liberación diversos factores pro-inflamatorios (citocinas, quimiocinas y radicales libres), los cuales, se propagan de forma descontrolada para conducir a un círculo vicioso que conduce a la muerte neuronal y a la progresión crónica de la enfermedad. En este sentido, se están investigando diversos tratamientos que permitan modular la reacción inflamatoria, con la finalidad de interrumpir el proceso neurodegenerativo presente en estas patologías.

Palabras claves: astrocitos, microglia, Interleucina-1 β , iNOS, estrés oxidativo muerte celular.

Abstract

Several evidences indicated that inflammation is a mechanism that could participate significantly in the progress of the neurodegeneration found in Parkinson's disease (PD) and Alzheimer (AD). Deregulation and overactivation of glial cells in the central nervous system resulting in the synthesis and release pro-inflammatory factors (cytokines, chemokines and free radicals), which, spread out of control to lead to a vicious circle leading to neuronal death and chronic progression of the disease. In this regard, various treatments are under investigation to modulate the inflammatory reaction, in order to interrupt the neurodegenerative process present in these pathologies.

Keywords: astrocytes, microglia, Interleukin-1 β , iNOS, oxidative cell death.

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la muerte de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso seguido del deterioro funcional de las partes afectadas. Las patologías más frecuentes y mejor conocidas son las enfermedades de Alzheimer (EA) y de Parkinson (EP), aunque existen otras afecciones, como, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Huntington, las cuales también pertenecen al mismo grupo clínico. Las enfermedades neurodegenerativas tienen un enorme impacto en la vida de los individuos afectados, en sus familias, y en misma la sociedad.

El mecanismo que impulsa el progreso crónico de las enfermedades neurodegenerativas continúa sin conocerse por completo. Es evidentemente, que las estrategias terapéuticas activas, destinadas al neurorescate son hasta ahora ineficientes. Por lo tanto, se convierte en fundamental y urgente la investigación que identifique el origen del progreso crónico de las enfermedades neurodegenerativas. La inflamación parece ser un denominador común en la enfermedades neurodegenerativas (EP y EA). Sin embargo, la naturaleza de su participación en la progresión de la enfermedad continúa sin esclarecerse por completo.

Aspectos generales de la inflamación del SNC

La inflamación es una compleja cascada de respuesta fisiológica a los estímulos nocivos del medio ambiente. Tradicionalmente, el sistema nervioso central (SNC) se consideró inmunológicamente privilegiado por su limitada capacidad inflamatoria y la escasa infiltración linfática. Mas tarde, se explicó que se debía a la existencia de la barrera hematoencefalica (BHE), la cual es una barrera física localizada entre los vasos sanguíneos y el tejido cerebral, que limita el acceso de casi todas las moléculas para proteger al cerebro de cualquier tipo de patógeno o sustancia tóxica. Actualmente se ha demostrado por estudios neuropatológicos y neuroradiológicos que el SNC es inmunológicamente especializado por la acción de las células de la glia, que son células residentes en el SNC, las cuales, regulan la inmunidad innata, constituyen la primera línea de defensa cada vez que se produce una lesión o enfermedad. Se puede detectar en una amplia gama de estímulos que afectan la homeostasis fisiológica, como los traumas del SNC, la isquemia, insultos tóxicos y las enfermedades neurodegenerativas [1,2].

La inflamación presente en las enfermedades neurodegenerativas, tanto agudas

como crónicas se dan como respuesta a una lesión o alteración en el SNC, consiste principalmente en una respuesta inmune innata que activa a las células de la glia (astrocitos y microglia), sintetiza y libera citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, proteínas de la cascada del complemento y especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) [1,3,4]. Todo esto puede ocurrir bajo un proceso bien regulado, con la finalidad de proteger a las células. Sin embargo, una respuesta inflamatoria excesiva y descontrolada puede ser una fuente adicional de daño para integridad y función de las células huésped, debido a que los tejidos neurales tienen una regeneración celular restringida, además de que el SNC es extremadamente vulnerable a los procesos inmunes e inflamatorios descontrolados [2].

Hasta la fecha, una gran cantidad de datos convincentes indican que la inflamación contribuye a la pérdida de neuronas en las enfermedades neurodegenerativa, pero se desconoce cómo es que la inflamación afecta de manera decisiva la progresión crónica de estas enfermedades, en este sentido describiremos en primer lugar la participación de las células de la glía en el proceso inflamatorio y posteriormente todos los procesos que derivan de la activación de dichas células.

El papel de la glia en la respuesta inflamatoria

El SNC esta constantemente supervisado por una red bien desarrollada de células inmunes, denominadas células gliales, las cuales controlan todos sus portales de entrada [4]. Estas, reaccionan enérgicamente ante cualquier estímulo inmunológico o al daño neuronal y desempeñan un papel activo en el desarrollo de la inflamación. Las células gliales se clasifican generalmente en dos grupos: 1) macroglia, que incluyen los astrocitos y oligodendrocitos, de origen ectodérmico, y 2) la microglia, de origen mesodérmico, que invaden el SNC durante el desarrollo embrionario en el momento de la vascularización [5]. Las células gliales difieren de las neuronas, ya que no poseen contactos sinápticos y tienen la capacidad de dividirse durante toda la vida. Las principales funciones de las células gliales son 1) mantener el medio iónico de las células nerviosas, 2) modular la velocidad de propagación de señales nerviosas, 3) modular la acción sináptica mediante el control de la captación de neurotransmisores, 4) proporcionar un cimiento para el desarrollo neural, y 5) ayudar en (o impidiendo, en algunos casos) la recuperación de una lesión neuronal [6].

La microglia constituye parte de los macrófagos, derivados de la médula ósea, se localizan en el SNC durante su desarrollo, comprenden hasta un 20% de la población total de células no neuronales y son especialmente importantes para proteger la integridad y la homeostasis del cerebro. En condiciones normales, la microglia se encuentra en reposo, pero si existe una lesión o infección se activan [7]. Una vez activada se somete a la maduración en dos estados diferentes: el activo y reactivo [8]. La microglia activada se caracteriza por ser una célula hinchada, ramificada, con un cuerpo celular más grande y con proyecciones más cortas. Expone receptores del complemento CR3 y el complejo de histocompatibilidad de clase-1 (MHC-1). Por otra parte, la microglia reactiva es más pequeña, esférica y carece de ramificaciones. Constituye los macrófagos en plena actividad incrementando la expresión del de MHC-I y MHC-II con la capacidad de presentar antígenos a las células T para su degradación.

Se ha reportado que en condiciones normales la expresión del MHC-I y MHC-II es generalmente muy baja, pero en casi todas las enfermedades neurodegenerativas su expresión incrementa [7], a causa del daño neuronal progresivo.

El mecanismo que regula la función de la microglia es pobremente comprendido. En recientes años se han tratado de explicar como es el vínculo entre los marcadores de activación de la microglia y la función celular específica que esta envuelve. Se propone que en las primeras etapas de la inflamación la microglia promueve la secreción de factores de sobrevivencia neuronal como el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) con el propósito de limitar el daño y proteger a la población de neuronas vulnerables así como reparar el tejido dañado. Por otra parte la microglia promueve actividades neurotóxicas al producir ROS y RNS como óxido nítrico (NO) y secretar prostaglandina, quimiocinas y citocinas (ver tabla 1). Si la activación de la microglia persiste por amplios periodos, se podría ocasionar un descontrol de la respuesta, que da origen a ciclo de inflamación que resulta crónico y que lleva al incremento local de la concentración de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas y otros mediadores pro-inflamatorios, los cuales contribuyen al daño del tejido [9]. Por lo tanto, la activación de la microglia influye en la extensión de la lesión cerebral después de un estímulo inflamatorio descontrolado, la activación microglial crónica esta implicada en una serie de enfermedades neurodegenerativas [10].

Un segundo tipo de célula de la glia son los astrocitos que residen en el SNC, participan en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos, actúan como puente para suministrar los nutrientes de los capilares sanguíneos a las neuronas y son el lugar principal de almacenamiento de glucógeno en el cerebro [11]. Por otra parte, también son capaces de sintetizar y secretar una variedad de factores neurotróficos y de crecimiento como el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y el factor de crecimiento derivado de insulina-1 (IGF-1), que puede ser benéfico para la supervivencia de las neuronas [12].

Los astrocitos una vez activados sufren diversas modificaciones estructurales denominadas astrocitosis. La característica principal de la astrocitosis es el aumento en el número y tamaño de la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) que es una proteína del citoesqueleto de filamentos intermedios expresados principalmente por los astrocitos y es considerada como el principal marcador de astrocitosis [13]. La función precisa de la molécula de GFAP todavía no es clara, aún no se ha establecido si el aumento en los niveles de GFAP es el resultado de una mayor producción de esta proteína por las células o un aumento en el número de astrocitos ya sea debido a la proliferación o la migración. Los astrocitos reactivos forman una cicatriz glial en zonas de necrosis de los tejidos, con exclusión de las células no neuronales y rellenan el espacio que resulta de la pérdida neuronal [14].

Una de las funciones importantes de los astrocitos activados es la participación en la respuesta inmune del SNC. Varios han demostrado que los astrocitos activos producen una variedad de moléculas, que están implicadas en la iniciación y regulación de la respuesta inflamatoria. Esto incluyen varias citocinas pro y anti-inflamatorias,

quimiocinas, los eicosanoides, la prostaglandinas y tromboxanos [15].

Por otra parte también se ha demostrado que los astrocitos activos lleva a la expresión de la ciclo oxigenasa tipo-2 (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [15] y formar así el NO, una molécula importante para causar estrés oxidativo y muerte neuronal. (ver tabla 1)

Es cada vez mas evidente que los astrocitos también tienen un papel importante en los desordenes neurológicos. Los modelos animales han demostrado que los astrocitos son pieza clave en el deterioro neuronal presente en las enfermedades neurodegenerativas, de ahí que son considerados como nuevos blancos terapéuticos para prevenir el deterioro neuronal [14].

Microglia	Astroцитos
Proteínas del Complemento	Proteínas del Complemento
Factores Neurotróficos: (GDNF)	Factores Neurotróficos: (GDNF, BDNF, CNTF;IGF-1)
Citocinas y Quimiocinas: (IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α , MIPC)	Citocinas y Quimiocinas: (IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α , MIPC)
ERO: (OH y O ₂ ⁻)	ERO: (OH y O ₂ ⁻)
ERN: (NO y ONOO ⁻)	ERN: (NO y ONOO ⁻)
iNOS	iNOS
	S-100
	COX-2

Tabla 1. Moléculas y productos liberados por la microglia y los astrocitos durante el proceso neuroinflamatorio.

Las citocinas como mediadores pro-inflamatorios

Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular producidas tanto por células inmunológicas como no inmunológicas. Las citocinas son importantes moduladores de la comunicación neuronal y la desregulación en su producción podría contribuir a desencadenar diferentes patologías, ya que ellas son reguladoras clave de la respuesta inmune innata y adaptativa [16]. En el cerebro las citocinas más notables son el factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- α), interleucina-1-beta (IL-1 β), interleucina-17 (IL-17) y interleucina-6 (IL-6). La familia de interferon-gamma (IFN- γ) y el factor de crecimiento transformante- beta (TGF- β). Todos ellos actúan en contexto para modular los procesos inflamatorios que afectan la permeabilidad de la BHE [16, 17].

La IL-1 β es una de las citocinas pro-inflamatorias más importantes para la progresión del proceso inflamatorio. Diversos estudios indican que la IL-1 β juega un rol importante en el desarrollo de lesiones neuronales agudas ya que el aumento en la expresión de IL-1 β en el SNC se observa después de provocar un daño cerebral o bien por la administración exógena de IL-1 β [18]. Así mismo se ha demostrado que la administración del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) previo a una lesión cerebral, reduce de forma significativa la muerte de neuronas de la corteza en ratas [19].

Estudios recientes han utilizado animales transgénicos con modificaciones específicas de los genes que expresan la IL-1 β para investigar la contribución de la inflamación en la neurodegeneración [20] y se ha mostrado que en los ratones deficientes IL-1 β muestran una reducción en la muerte celular a pesar de que los animales sean sometidos a diferentes insultos neuronales [21] lo que indica la importancia que tiene la IL-1 β en promover el progreso de la neurodegeneración.

Así mismo se ha demostrado que la IL-1 β inducen la expresión de la iNOS que desencadena la liberación de NO en las células gliales (astrocitos y microglia) y causar estrés oxidativo. Por sus propiedades pro-inflamatorias y su papel en la respuesta inmune innata se ha pensado que la IL-1 β podría estar implicada en los mecanismos fisiopatológicos de una amplia gama de enfermedades neurodegenerativas.

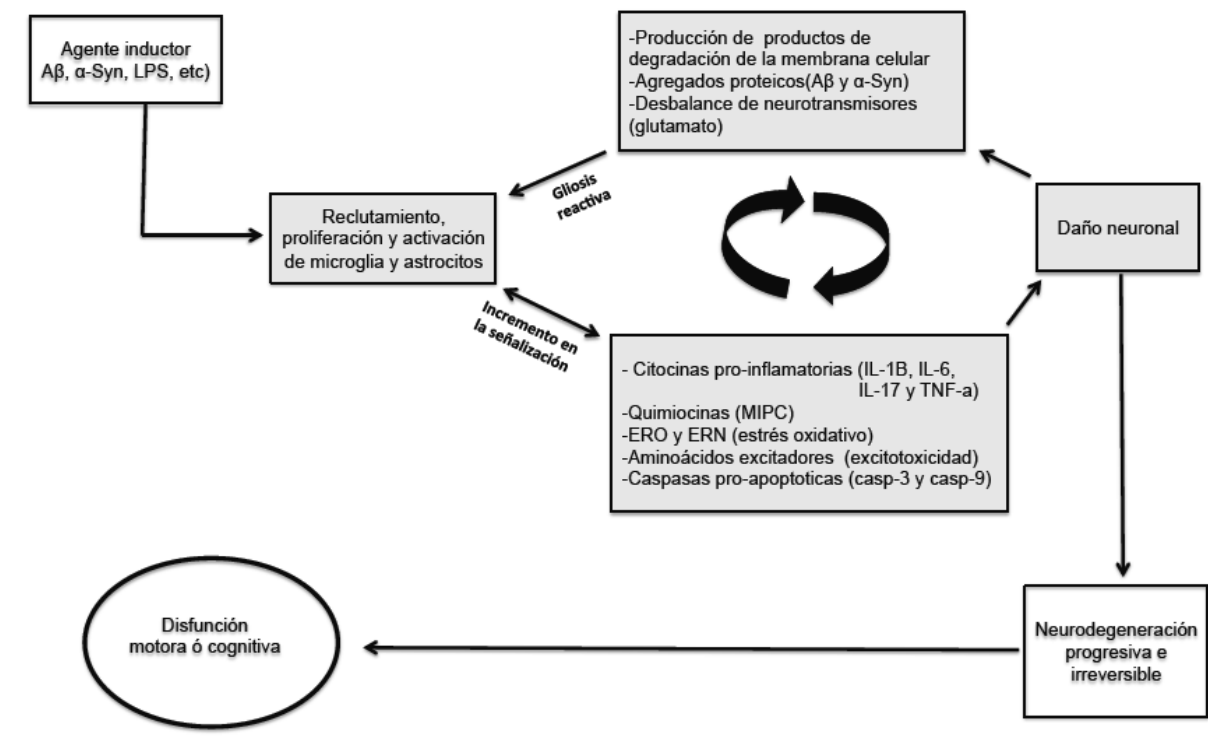


Figura1. La inflamación determina la progresión de la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas. Agentes inductores en el SNC (A β , α -syn, LPS) activan a la glia para producir y secretar un espectro de mediadores de la inflamación, como las citocinas, quimiocinas, EROs y ERN, además de aminoácidos excitadores y caspasas pro-apoptóticas en el medio extracelular. Esto con la finalidad de producir daño neuronal, además de productos de degradación anormal de la membrana, agregados proteicos y alteraciones en la concentración de neurotransmisores, los cuales favorecen la gliosis reactiva. En este sentido, la respuesta inmune puede llegar a ser exagerada y destructiva, y se convierte en la inflamación crónica y persistente que conduce a neurodegeneración progresiva e irreversible induciendo a un círculo vicioso que causa el deterioro cognitivo ó motor y dar origen a la progresión de las enfermedades neurodegenerativas crónicas como la EA y EP.

El descontrol en la inflamación genera un círculo vicioso que daña a las neuronas y causa el progreso de la enfermedad.

El daño agudo en el SNC puede ocasionar la degeneración neuronal. La cuestión radica en como este daño inicial en las neuronas se transforma en una neurodegeneración crónica y progresiva. Se postula que el daño en las neuronas activa una señal descontrolada en la glía para inducir la gliosis reactiva, la cual, agrava aun más el daño neuronal, mediante la liberación de factores inflamatorios y neurotóxicos. A pesar de esto, no queda nada claro que podría impulsar la inflamación en los pacientes con las enfermedades neurodegenerativas anteriormente mencionadas. Recientes trabajos experimentales sugieren que como resultado del daño celular, las neuronas producen de forma constante compuestos nocivos que son liberados al medio extracelular, los cuales pueden ser los responsables de inducir la gliosis reactiva.

Estos compuestos incluyen productos de degradación de la membrana, proteínas procesadas, modificadas o agregadas de forma anormal, así como moléculas alteradas o incrementadas como los neurotransmisores excitadores (glutamato) [21,22]. Todos estos compuestos endógenos activan el patrón de receptores de reconocimiento expresados en las células de la glía para activar una respuesta inflamatoria que se auto amplifica. En este sentido, se pierde el control estricto de la inflamación y sus características defensivas se inhiben para producir efectos neurotóxicos, en consecuencia se genera un círculo vicioso entre las neuronas lesionadas y la inflamación descontrolada, y de esta forma desencadenar la sintomatología clínica propia de cada enfermedad neurodegenerativa [6] (ver Fig1).

Evidencias de la inflamación en las enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas están caracterizadas por la pérdida de poblaciones específicas de neuronas, así como por la acumulación de agregados fibrilares extracelulares. La formación de estos agregados proteicos resulta de la interacción proteica anormal y de un plegamiento aberrante que genera la mutación, oxidación y agregación de proteínas. Las cuales han sido consideradas como inductoras de la disfunción neuronal y una característica de diversas enfermedades neurodegenerativas. Una vía común de estos eventos moleculares y celulares es la activación de células de la microglia y astrocitos en regiones específicas del cerebro. Si los agregados proteicos no pueden eliminarse se dispara la activación crónica de las células de la glía que deriva en la neuroinflamación crónica y el estrés oxidativo, para contribuir en la disfunción neuronal progresiva que contribuye a la degeneración presente en las principales enfermedades como la EA y EP.

- Evidencia de la inflamación en la enfermedad de Alzheimer

La mayor evidencia del papel de la inflamación crónica del SNC en los trastornos proviene de estudios sobre la EA. Considerada como la enfermedad neurodegenerativa más común, aproximadamente el 10% de todas las personas mayores de 65 años y hasta el 50% de los mayores de 85 años son diagnosticadas con esta enfermedad. Es un trastorno irreversible y progresivo caracterizado por la pérdida de neuronas sobre

todo en la corteza cerebral y el hipocampo [23,24]. Su etiología no está clara, sin embargo, las evidencias sugieren que la acumulación de A β en las placas neuríticas y los restos de una proteína tau actúan como los factores activantes de la respuesta inflamatoria, que provocan cambios reactivos en la microglía, la expresión de TLR-2 y 4, la liberación de citocinas (IL-1 β y IL-6) [25] y productos potencialmente neurotóxicos como los ERO, el NO, el glutamato extracelular excesivo [26]. Todos estos productos tóxicos inflamatorios contribuyen a la muerte de células neuronales, que además se activa la reacción inmune y conduce a una neurodegeneración crónica y progresiva

La evidencia de la importancia que tiene la inflamación en el daño neuronal proviene en primer lugar, de los estudios inmunohistoquímicos y de biología molecular hechos en los tejidos cerebrales de pacientes con EA, que revelaron los rasgos distintivos de la inflamación, incluyendo la activación de la microglia y astrocitos, la expresión de citocinas y la invasión de las células inmunes. En segundo lugar, el tratamiento crónico de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), como aspirina e ibuprofeno, los cuales disminuyen el riesgo significativamente menor de desarrollar esta enfermedad [27].

- Evidencias de la inflamación en la enfermedad de Parkinson

Procesos similares se observan en la EP, una enfermedad crónica, progresiva neurodegenerativa que se caracteriza por la degeneración de la dopamina (DA) en las neuronas nigroestriatales y de la sustancia nigra. Según una hipótesis común, la neurodegeneración en el Parkinson establece en la acumulación anormal de la proteína α -sinucleína en las neuronas, al igual que A β en la EA. Estos agregados desencadenan la activación de las células gliales y la progresión de la inflamación. De hecho, la microglía activada, y en menor medida y los astrocitos reactivos, se encuentran asociados con la pérdida de células neuronales, lo que podría contribuir al proceso inflamatorio por la liberación de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α , IL-1 β e IL-6 [28], las prostaglandinas (PGE2, PGD2), los ROS y el NO. El tratamiento anti-inflamatorio con AINEs o dexametasona ha demostrado tener un papel beneficioso también en la EP, aunque es mucho menos evidente que en el caso de EA [29].

La terapéutica actual para la inflamación presente en las enfermedades neurodegenerativas.

La identificación de dianas terapéuticas depende de una clara delimitación de los efectos benéficos y perjudiciales de la inflamación y la función de determinados mediadores inflamatorios en estados agudos como crónicos presentes en las enfermedades neurodegenerativas. En general los tratamientos anti-inflamatorios pueden ser beneficiosos en la prevención de lesiones. Por ejemplo, se ha observado que una terapia combinada de L-DOPA con agentes anti-inflamatorios como la aspirina y la dexametasona pueden ser los más beneficiosos para retrasar la sintomatología de la EP [29].

Por otra parte se ha sugerido algunos agentes farmacológicos como la minociclina, un antibiótico de tetraciclina, que tiene actividades neuroprotectoras, podría ser beneficiosa en muchos trastornos del SNC. La minociclina inhibe la activación microglia, reduce la expresión de citocinas, y las actividades de iNOS [30].

Así mismo se ha visto que el aumento de NO y la expresión de iNOS se ha

controlado con el uso de los inhibidores de la iNOS considerados como agentes potenciales incluyendo los de origen natural como la vitamina-D3, y el N (omega)-mono-metil-L-arginina). Sin embargo los resultados solo se han mostrado en modelos experimentales con animales. Otras terapias van dirigidas hacia la IL-1 que es considerada como una de las terapias más prometedoras a futuro, para los trastornos del SNC, en gran parte porque el antagonista natural (IL-1ra), que es bien tolerado, utilizado en la clínica para el tratamiento de la artritis reumatoide. Otras estrategias para modificar la concentración de la IL-1 son la inhibición de su expresión, y la activación de su degradación por ejemplo, a través de los inhibidores de la caspasa-1, sin embargo los resultados no han sido convincentes [27].

La orientación al bloqueo de otras citocinas está menos avanzado, las moléculas conocidas como anti-citocinas inflamatorias (por ejemplo, la IL-10, factor de crecimiento transformante- β y IFN- γ) han demostrado los efectos neuroprotectores, pero los datos son limitados hasta el momento, además de que los efectos secundarios han resultado un problema [24].

El fracaso de numerosos ensayos clínicos se debe a que en algunos casos, la eficacia limitada de la sustancia de ensayo, los efectos secundarios inaceptables o el mal diseño de los ensayos clínicos [30]. Es necesario realizar una amplia investigación con modelos experimentales en especies superiores como los primates, sin embargo esto plantea evidentes cuestiones éticas. También puede ser necesario llevar a cabo un estudio sobre la identificación de otras dianas terapéuticas antiinflamatorias para los trastornos del SNC, debido a que los modelos experimentales disponibles son un tanto limitados.

Conclusiones

En la última década, se ha demostrado que la inflamación desempeña un papel clave en la enfermedad del SNC. El sello distintivo de la inflamación del SNC, es la activación microglial, la generación y la liberación de mediadores pro-inflamatorios incluyendo citocinas, NO y los radicales libres. Dado que muchos de estos agentes son pro-inflamatorios y conducen a la pérdida neuronal, que representan los posibles candidatos terapéuticos. Sin embargo, aún queda mucho por comprender acerca de la naturaleza de la inflamación del SNC antes de que pueda ser llevado con éxito en los tratamientos clínicos.

La activación microglial en algunos casos puede ser neuroprotector y podrán participar en la reparación a largo plazo y la recuperación. La compleja interacción y el equilibrio entre estos diversos mediadores, el envejecimiento, y los factores ambientales en última instancia puede determinar el resultado de una lesión aguda del SNC y regular la iniciación y progresión de la neurodegeneración crónica la comprensión de estas interacciones con mayor detalle de esperar que conduzca a la elaboración de terapias eficaces para las enfermedades del SNC intratables.

Referencias

1. Hanisch, U.K. and Kettenmann, H. (2007) *Nat Neurosci.* **10**:1387-1394.
2. Carson, M.J., Doose, J.M., Melchior, B., Schmid, C.D., Ploix, C.C. (2006) *Immunol Rev.*

- 213:48-65.**
3. Gao, H.M. (2003) *Trends Pharmacol Sci.* **24**: 395-401.
 4. Block, M.L., Hong, J.S. (2005) *Prog Neurobiol.* **76**(2): 77-98.
 5. Boztug, K., Carson, M.J., Pham-Mitchell, N., Asensio, V.C., DeMartino, J., Campbell, I.L. J. (2002) *Immunol.* **169**: 1505-1515.
 6. Trifilo, M.J., Lane, T.E. (2003) *J Neurovirol.* **9**: 315-324.
 7. Kreutzberg, G.W. (1996) *Trends Neurosci.* **8**: 312-318.
 8. Davis, E.J., Foster, T.D., Thomas, W.E. (1994) *Brain Res Bull.* **34**: 73-78.
 9. Liu, B. and Hong, J.S. J. (2003) *Pharmacol Exp Ther.* **304**: 1-7.
 10. Wyss-Coray, T. and Mucke, L. (2002) *Neuron.* **35**: 419-432.
 11. Aloisi, F. (1999) *Adv Exp Med Biol.* **468**: 123-133.
 12. Moretto, G., Walker, D.G., Lanteri, P., Taioli, F., Zaffagnini, S., Xu, R.Y., Rizzuto, N. (1996) *Cell Tissue Res.* **286**(2): 257-262.
 13. Raine, C.S. (2000) *Neurobiol Aging.* **21**(3): 437-240.
 14. McGraw, J., Hiebert, G.W., Steeves, J.D. (2001) *J Neurosci Res.* **63**(2): 109-115.
 15. Mrak, R.E., Griffin, W.S. (2005) *J Alzheimers Dis.* **8**(4): 369-375.
 16. Liu, R., Xiao, N., Tian, K.L., Diao, Y.F. (2002) *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* **35**(3): 211-217.
 17. Laurenzi, M.A., Arcuri, C., Rossi, R., Marconi, P., Bocchini, V. (2001) *Neurochem Res.* **26** (11): 1209-1216.
 18. Saijo, K., Crotti, A., Glass, C.K. (2010) *Adv Immunol.* **106**: 21-59.
 19. Hailer, N.P., Vogt, C., Korf, H.W., Dehghani, F. (2005) *Eur J Neurosci.* **21**(9): 2347-2360.
 20. Diaz, A., Limon, D., Chávez, R., Zenteno, E., Guevara, J. (2012) *J Alzheimers Dis.* **30**(3):505-22.
 21. Grilli, M., Goffi, F., Memo, M., Spano, P. (1996) *J Biol Chem.* **271**(25):15002-15007.
 22. Floden, A.M. (2005) *J. Neurosci.* **25**: 2566-2575.
 23. Rubartelli, A. and Lotze, M.T. (2007) *Trends Immunol.* **28**: 429-436.
 24. Selkoe, D., Mandelkow, E., Holtzman, D. (2012) *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2**(1):11460-11469.
 25. Maccioni, R.B., Rojo, L.E., Fernández, J.A., Kuljis, R.O. (2009) *Ann N Y Acad Sci.* **1153**: 240-246.
 26. Fernández-Vizarra, P., Fernández, A.P., Castro-Blanco, S., Encinas, J.M., Serrano, J., Bentura, M.L., Muñoz, P., Martínez-Murillo, R. (2004) *J Neurobiol Dis.* **15**(2): 287-305.
 27. McGeer, P.L., Rogers, J., McGeer, E.G. (2006) *J Alzheimers Dis.* **9**(3 Suppl): 271-276.
 28. Teismann, P., Schulz, J.B. (2004) *Cell Tissue Res.* **318**(1): 149-161.
 29. Sawada, M., Imamura, K., Nagatsu, T. (2006) *J Neural Transm Suppl.* **70**: 373-381.
 30. Minghetti, L. (2004) *Exp Neurol.* **63**(9): 901-910.

Semblanza del Dr. Alfonso Díaz



Egresado de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP en el 2006 como Químico Farmacobiólogo. Realizó sus estudios de maestría y Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular en BUAP. Su trabajo se enfocando a comprender la participación del estrés nitrosativo y la respuesta inflamatoria en la toxicidad que causa el amiloide- β en modelos de la Enfermedad de Alzheimer. Es profesor de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, imparte materias como fisiología, farmacología y toxicología. Cuenta con un número considerable de Publicaciones nacionales e internacionales en revista de alto impacto, además de colaborar como revisor de revistas internacionales afines al área.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVI, 138 – 152**, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

DON JOSÉ LAGUNA GARCÍA, EL “MAISTRO LAGUNA”

DON JOSÉ LAGUNA GARCÍA, EL “MAISTRO LAGUNA”

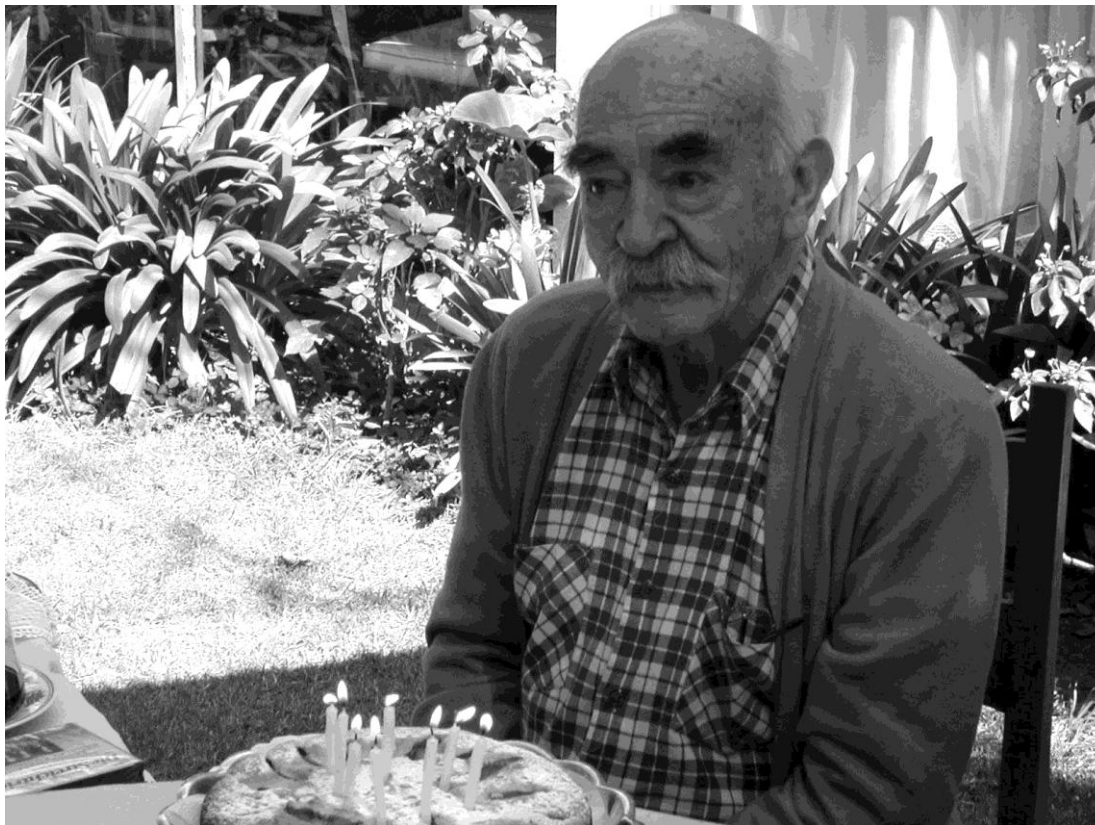
Antonio Peña Díaz

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM
UNAM. Ciudad Universitaria, CP 04510, México, DF
apd@ifc.unam.mx

Aunque tal vez no venga al caso mencionarlo, mi oportunidad de conocer y tratar al “maestro” Laguna, no tuvo lugar sino en el mes de septiembre de 1958, ya iniciado en sus labores formales como Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, ante lo que se veía entonces sólo como una serie de intenciones y sueños de ese personaje extraordinario, sobre todo en la Bioquímica mexicana y en la Sociedad Mexicana de Bioquímica, pero también en otras áreas, como la de Salud Pública. No es fácil resumir en un espacio pequeño tantos años, desde sus ideas iniciales, sus innumerables luchas, éxitos y fracasos, pero al final con el balance positivo de los primeros, ante uno de los ejemplos más claros de lo que puede lograrse mediante una serie de ideas perseguidas y ejecutadas con una persistencia y un entusiasmo inflexibles ante circunstancias pocas veces favorables.

En aquellas épocas, cualquiera hubiera considerado que el Dr. José Laguna, más que contar con un plan preconcebido y coherente, padecía una locura, y sólo eso, pero

además, tampoco simple, sino múltiple, digna sólo de un soñador o un visionario. Su principal obligación era modificar y modernizar la enseñanza de la Bioquímica en la Facultad de Medicina, pero no conforme con tal cosa, tenía la firme idea de establecer un grupo de investigación en una Facultad y una Universidad que no estaban diseñadas, no digamos para impulsarlas o favorecerlas, sino siquiera para tolerarlas. Más aún, pretendía iniciar un proyecto de formación de nuevos académicos, a partir de jóvenes estudiantes de la carrera, en un principio, simplemente incrustándolos en pequeños proyectos de investigación, sobre bases y metodologías modernas y a la altura de cualquier laboratorio del mundo.



El Dr. José Laguna a sus 80 años (1921-2011)

Como algo que podría ser ahora mismo un ejemplo para nuestros directores, en primer lugar, el Director, Dr. Raúl Fournier supo de su existencia y lo designó Jefe del Departamento de Bioquímica, a sabiendas de que sería, no un subalterno sumiso, como muchos jefes actuales, sino una verdadera lata, que pedía y pedía para su visionaria empresa.

Luego, como ejemplo para los jefes pasados y actuales, podemos resumir su extraordinaria labor:

- Organizó los cursos y estableció reglas estrictas para los profesores;
 - Ay de aquel que llegara tarde, y peor aún si osaba faltar.
 - Ay de aquel que no cumpliera con el Programa.

- Instituyó los exámenes departamentales, que no eran sólo para los alumnos; todos los profesores debíamos resolverlos.
- Fue reclutando jóvenes con la idea de sustituir a los viejos y anquilosados profesores de muchos años, cosa que logró en poco tiempo.
- Escribió el libro “Bioquímica” como texto necesario para el curso en la Facultad, que fue durante muchos años adoptado como tal en varios países de Latinoamérica.
- Inició un grupo de investigación a partir de algunos colegas en quienes vio capacidad para realizarla.
- Inició activamente el reclutamiento de jóvenes para el mismo fin; hasta donde yo sé, los primeros fueron Armando Gómez Puyou, Enrique Piña y Victoria Chagoya, yo llegué ya en 1958, y luego muchos otros.
- Convenció a las autoridades de la conveniencia de contar con más plazas de profesores de tiempo completo para la doble actividad de la docencia y la investigación.
- Aun con los pocos medios existentes, arrancó dos líneas de investigación, que no obstante la situación, se consolidaron en nuestras primeras publicaciones en revistas internacionales.
- Estableció, con lo que podríamos llamar la complicidad de Guillermo Soberón y su segundo de abordó Jesús Guzmán, un posgrado informal, que podríamos ahora llamar pirata, en Bioquímica. Pirata porque no tenía la aprobación del Consejo Universitario, que no se logró sino hasta 1969.
- También con el mismo cómplice, Soberón, logró conjuntar a 14 académicos para fundar en julio de 1957, la Sociedad Mexicana de Bioquímica y organizar sus actividades.

Esta aparente imagen de que su idea era locura o fantasía se podía reforzar con tan sólo echar un vistazo a los medios disponibles: La planta de profesores, en su mayoría anquilosada, revisaba textos más bien pasados de moda, traducidos del inglés siempre con retraso, y un programa de la materia también en el mismo tenor. Atraer jóvenes, en especial hacia la Bioquímica, aparentemente tan complicada y hasta odiada por los estudiantes, tampoco parecía factible. Las instalaciones mismas, fuera de unos laboratorios para las prácticas, lejos estaban de acercarse a la enseñanza práctica de la Bioquímica. Los espacios para investigación eran casi sólo eso; laboratorios con mesas de trabajo, material de vidrio y casi nada de equipo. Y sin espacios adecuados ni equipos, menos había fondos para adquirir los reactivos necesarios para una investigación en serio. El mismo material humano de los primeros profesores de tiempo completo, si bien entusiasmado en la misma empresa loca, distaba mucho de ser suficiente. Nada de esto arredró sin embargo, a aquel joven visionario, que con una energía, un entusiasmo y una capacidad de convencimiento pocas veces visto, fue abatiendo todos y cada uno de los obstáculos.

Para lograr una mejor enseñanza de la materia, con el apoyo de nuestro querido y sabio Dr. Jesús Guzmán, “Chucho”, rehizo el programa de la materia, pero además lo desglosó en guiones que cada profesor debería seguir, para uniformar la docencia; entre ambos diseñaron nuevas y más modernas prácticas de laboratorio, y, cosa nada fácil hasta la fecha, estableció una disciplina estricta, tanto en el cumplimiento de la asistencia, como en la capacidad para la docencia, y lentamente en el tiempo fue

sustituyendo a los profesores de menor calidad por otros más jóvenes que se iban formando. Una vez lograda tal cosa, se pudieron instituir los exámenes departamentales, que aseguraban una evaluación uniforme para todos los grupos. No está demás señalar que al imponer los exámenes departamentales y antes de calificarlos, también los profesores debíamos resolverlos. Encima de todo, se lanzó a escribir en un tiempo relativamente corto, un texto completo y moderno de Bioquímica, a la altura de los más modernos de la época.



Laboratorio del Dr. José Laguna (1959)

Para allegarse fondos, se instituyó una cuota adicional por el laboratorio de Bioquímica, que permitía por una parte cubrir los gastos de los laboratorios de enseñanza, pero además, parte de los gastos de los incipientes proyectos de investigación. Ya desde 1956 había logrado reclutar a los primeros incautos, Armando Gómez Puyou y Enrique Piña, estudiantes, y Victoria Chagoya, química. De hecho, fue gracias a Armando Gómez Puyoy, mi compañero en la carrera, que intercedió por mí ante el “maestro” para que me aceptara para trabajar en algún proyecto para mi tesis de licenciatura, trabajando bajo su tutela y la del Dr. Guzmán. Poco a poco se fueron agregando otros a su grupo, al de Raúl Ondarza y al de Félix Córdoba, principalmente.



Algunos de los integrantes del grupo de investigación del Dr. Laguna.

Nuestros proyectos giraban principalmente alrededor de los efectos de los esteroides suprarrenales sobre distintos sistemas, pero principalmente sobre la gluconeogénesis y el metabolismo mineral en embriones de pollo. Otra línea consistía en un intento de bloquear la absorción del colesterol con la diosgenina, materia autóctona de partida para la entonces nueva síntesis de las hormonas esteroideas. También tenía a su cargo, con otros profesores, la producción nacional de la vacuna "Salk", contra la poliomielitis, recién desarrollada, en los laboratorios Behring, en la calle Arenal, cerca de la Ciudad Universitaria, que se producía replicando el virus en células cultivadas de mono. Dado que ahí existían las facilidades para cultivar células animales, nos envió a Armando Gómez, Enrique Piña y a mí, a estudiar los efectos de la hidrocortisona sobre la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en células cultivadas de riñón de conejo. Este fue el tema de las tesis de licenciatura de Armando Gómez Puyoy y mía.

Por esas mismas fechas apareció de regreso a México otro joven igualmente ambicioso y decidido, que pronto encontró forma, no sólo de participar, sino de convertirse en otro promotor central de las mismas ideas, sólo que más en el ámbito de la investigación. Fue sin duda la asociación de Guillermo Soberón y José Laguna un suceso que no sólo implicó la duplicación de esfuerzos, sino la potenciación mutua. En 1957, antes de la creación de la ahora Academia Mexicana de Ciencias, y de la misma Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, se creó la Sociedad Mexicana de Bioquímica, y se instituyó un posgrado, que inicialmente, y por razones de una mejor acogida y agilidad, se alojó en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico, y dio lugar a los primeros doctorados en Bioquímica en México. Ya a principios de los años sesentas, se fue organizando otro posgrado en la UNAM, que empezó a operar de una manera en buena parte, "pirata", diríamos ahora, coordinado

por el Dr. Guzmán, mediante cursos en la Facultad y en el Instituto de Química, y otros intensivos con investigadores invitados del extranjero. Era pirata porque no fue aprobado por el Consejo Universitario sino hasta 1969. Para entonces ya éramos “estudiantes” del posgrado, de nuestro grupo, Armando Gómez, Marietta Tuena, Victoria Chagoya, Enrique Piña Edmundo Chávez y yo. Luego se fueron incorporando otros más, como Sergio Estrada O., la inolvidable Aurora Brunner, Alfonso Cárabez, Carlos Gómez Lojero, Juan Díaz Zagoya, así como otros de los demás grupos del Departamento.

Toda esta especie de “leva” de estudiantes, se reforzó por la existencia del grupo del mismo Guillermo Soberón y el de Guillermo Massieu; el primero, en un principio en el Instituto Nacional de Nutrición, y luego en el de Investigaciones Biomédicas, y el segundo, más pequeño, en el Instituto de Biología. De hecho, este fue sin duda el nacimiento de la Bioquímica en la UNAM. Dicho sea de paso, y como muestra de su generosidad, el maestro Laguna se las arreglaba también para financiar algunas compras de reactivos del grupo del Dr. Massieu, creador a su vez de la neuroquímica en México.



Como complemento de nuestra preparación, una parte importante de la formación adicional de unos cuantos jóvenes en la investigación, consistía en frecuentes visitas de investigadores extranjeros, que impartían conferencias y cursos intensivos. En este tenor se organizó, por ejemplo, un Simposio Internacional sobre Regulación Enzimática, en el que participaron algunos de los mejores bioquímicos del mundo, Hans Krebs entre ellos. Una actividad adicional consistía en visitas de algunos meses a los laboratorios de los amigos de nuestros maestros, y desde luego, en el caso nuestro, del Maestro Laguna. Fue así que primero envió a Victoria Chagoya a la Universidad de

Wisconsin; en 1961 a mí me envió al laboratorio de Abraham White; a Enrique Piña al entonces Instituto Rockefeller, con Edward Tatum; a Sergio Estrada a Wisconsin, con Henry Lardy; y a Armando Gómez a algún lugar de Oklahoma, de donde se regresó a los tres días para luego casarse con Marietta Tuena.

Pero con todo y las cuotas de los estudiantes, los recursos para investigación eran magros; así se lanzó un buen día a la búsqueda de financiamiento externo, nada menos que con la Fundación Rockefeller, en Nueva York, hecho que revela por una parte su arrojo, pero también algo poco o nada común en México en aquellas épocas, su capacidad de convencimiento ante cualquier instancia, donde fuera, y la firmeza de sus propósitos sin detenerse ante nada. En efecto, vino una delegación de la Fundación, a la que presentó los proyectos, los participantes y los resultados, pero lo difícil llegó a la hora que preguntaron por las publicaciones, que desde luego, no existían. Muy gentiles, sin embargo, le propusieron una especie de condición: podrían apoyarlo en el momento en que aparecieran los "papers". Fue así que se estableció una etapa de trabajo intenso de todo el grupo, de sol a sol y de lunes a domingo, para redondear los estudios existentes y llevarlos a la publicación lo antes posible. El primer trabajo se publicó en 1962, y el segundo fue también aceptado en ese año para aparecer al siguiente; pero el resultado tal vez más importante fue el apoyo consiguiente de \$125,000 dólares, que nos cambió la vida.

Este cambio de vida se dio de dos formas: La primera consistió en la adquisición de equipo nuevo, entre el que se contaban dos centrífugas refrigeradas, con un aditamento para centrifugar a velocidades de unas 10,000 RPM, una ultracentrífuga, un espectrofotómetro Beckman, con un sistema de registro, dos o tres espectrofotómetros Zeiss, uno con un aditamento para fluorescencia, y varios otros juguetes, así como algo de dinero adicional para reactivos y materiales. Pero sin duda que el cambio más importante consistió en que cada uno de nosotros fue buscando su camino; con la compra de la centrífuga refrigerada de alta velocidad, Armando Gómez Puyou preparó sus primeras mitocondrias, y nació propiamente la bioenergética en México. Enrique Piña y Victoria Chagoya abrieron una línea de investigación alrededor de un tema, que hasta donde me acuerdo, surgió de una idea medio loca del Maestro Laguna; les sugirió inyectar ratas con una preparación de RNA que había en el laboratorio, y los resultados, también hasta donde me acuerdo, fueron espectaculares, en el sentido de un aumento notable de la cantidad del glucógeno hepático. Posteriormente lograron diseccionar el efecto, y encontraron que se debía a la adenosina, línea que hasta la fecha cultivan ambos. Aurora Brunner empezó a trabajar sobre genética de las levaduras, en un principio sin un objetivo claro, pero después sobre algunos componentes de la cadena respiratoria, y lo importante fue que algunos años después, así se inició el área de la genética molecular y luego de la Biología Molecular en nuestro grupo. Sergio Estrada, en parte inducido por los intereses de Armando Gómez, empezó estudiando la entrada y la salida de algunas enzimas de las mitocondrias, asesorado en buena parte por Félix Córdoba; pero durante su productivo viaje al laboratorio de Henry Lardy, se interesó de lleno en el estudio de la bioenergética y la influencia de diversos ionóforos. Marietta Tuena se descarrió algún tiempo; decidió estudiar la fosforilación oxidativa de las mitocondrias del cerebro de la rata, en el laboratorio del Dr. Massieu, pero luego regresó al buen camino, al lado de Armando. En cuanto a Armando Gómez y yo, decidimos involucrar a dos alumnos que el Dr. Laguna nos encomendó, en el estudio de los efectos del sodio y del potasio sobre las funciones mitocondriales, partiendo de

un hallazgo fortuito mío, que consistía en que la glutamato deshidrogenasa funcionaba mejor en presencia de sodio que de potasio.

No encontramos de entrada mayores efectos, salvo que Armando, todavía entusiasmado con los esteroides, y que nunca se da por vencido, encontró que el potasio, en presencia de un esteroide sintético, la triamcinolona, y no el sodio, tenía sorprendentes efectos sobre la fosforilación oxidativa y sus componentes conocidos. Curiosamente, estos efectos fueron descritos antes de los publicados por Cyrill Moore y Berton Pressman, en 1964 para la valinomicina. Al paso del tiempo, sin embargo, resultó que los efectos de la triamcinolona se debían a una contaminación del esteroide con valinomicina. Yo, por mi parte, recibí una invitación del Dr. White para hacer una segunda estancia en su laboratorio, y allá voy a Nueva York en 1964, a trabajar sobre los efectos del cortisol sobre la síntesis de proteínas en el timo de la rata. No obstante los tres trabajos resultantes, así como un buen número de citas, decidí buscar un sistema para estudiar los efectos diferenciales del sodio y el potasio. Durante el año en Nueva York, busqué y busqué en la literatura, hasta que encontré un trabajo de Aser Rothstein, en el que reportaba un efecto notable del potasio sobre la fermentación de la levadura. Adopté la idea de tomar este sujeto experimental, y a mi regreso planteé a nuestro Maestro la idea; no sólo me dejó hacer, sino que en lo posible me apoyó hasta con un lugar para incubar mis levaduras compradas en una panadería. Continuamos colaborando algunos años, Armando, Marietta y yo en los efectos del sodio y el potasio sobre las mitocondrias, en un proyecto desarrollado con gran imaginación por Armando, en el que describió un efecto importante de los cationes monovalentes sobre el llamado sitio I de la fosforilación oxidativa. Yo por mi parte, trabajando con la levadura y también en colaboración con ellos, e influenciados en gran parte por Sergio Estrada, tuvimos la fortuna de proponer el mecanismo del transporte del potasio por la levadura, que luego resultó ser general en todos los hongos y en las plantas.



Dr. Antonio Peña (1978).

Todo lo anterior viene al caso para plantear la extraordinaria labor promotora del Dr. Laguna, mucho más que de dirección de cada uno de nosotros. Sin duda que lo más valioso fue un apoyo casi irrestricto a nuestros proyectos, y una libertad también casi absoluta para hacer lo que nos viniera en gana. La única supervisión que ejercía consistía en la presentación de nuestros resultados en los seminarios de los sábados a las 8:15 de la mañana, y desde luego, de vernos trabajar, entusiasmos día con día, y apoyarnos dentro de las posibilidades económicas del Departamento. La principal regla era: El que no trabaje, se va.

A partir de de 1968, la UNAM no volvió a ser la misma. Había antes las llamadas Sociedades de Alumnos, lacras a cargo de unos cuantos vivales que obtenían de los Directores “favores”; una especie de mafias que cobraban una cuota de “protección”, que de no recibir, traducían en movimientos supuestamente en pro de los alumnos, que podían llevar inclusive a la renuncia del Director. En su lugar se crearon y sucedieron los “comités de lucha”, “de huelga” y muchos otros nombres, casi cómicos, que fueron, son, y parece que seguirán siendo otra lacra para la UNAM, como herencia de aquellos años. Cundió como la peste la idea de que cualquiera puede y debe participar en la dirección de la Universidad, y aunque en ocasiones con razón, suele partirse de que las autoridades son corruptas, ineptas, y que conviene que algunos vivales, casi nunca buenos, ni como estudiantes, ni como académicos, tomen las decisiones. Luego del 68, la izquierda mexicana, nunca y desde el principio sincera, devino en una fuerza política que se percató de que las universidades, y en particular la UNAM, podían ser armas políticas poderosas. Importante para nosotros: al tiempo que se instalaba ese “movimiento”, fue designado Director de la Facultad nuestro Maestro, el Dr. José Laguna.

Pero dentro de esa nueva política, organismos y grupos pensaron en una estrategia mejor: si las universidades como tales podían serles de gran valor, mejor que manipular a los estudiantes y profesores, sería apoderarse de su control; y qué mejor que instaurar un sistema de cogobierno, con la participación de estudiantes y profesores.

Desafortunadamente para nosotros, el primer frente de lucha se abrió en la Facultad de Medicina, instrumentado por un grupo del Departamento de Microbiología y Parasitología, incluso la participación del Jefe del Departamento y algunos de sus profesores, y un líder estudiantil, por cierto priísta, luego izquierdista y después de nuevo priísta. La idea cundió a algunos profesores, incluyendo a uno de nuestros maestros, siempre un excelente investigador, pero también un izquierdista convencido.

Debo confesar que, ingenuo, tomé de entrada partido por ellos en la primera reunión formal (una asamblea, desde luego). Sin embargo, por el consejo, que siempre he agradecido, de Victoria Chagoya, hablé con el Dr. Laguna, quien me dibujó, cual profeta, el panorama que se nos venía, sin equivocarse en nada. El atractivo de la propuesta, de participar todos en las decisiones de la Facultad, y después de toda la UNAM, arrastró a no pocos estudiantes, y todavía otros profesores. El “movimiento” creció, y llegó a ser de tal magnitud que resultó en una larga huelga, e impidió en parte que el Dr. Laguna lograra sus planes de mejorar la Facultad, abarrotada su agenda por los problemas políticos.

En el intento de “negociar” con aquellos sátrapas, que como siempre, lo último que quieren es negociar, se formó una llamada “Comisión Mixta” o “Gran Comisión”, a la que fuimos a dar varios de los entonces jóvenes bioquímicos. Nada sin embargo pudo detener lo que se veía venir y ocurre siempre: la intransigencia absoluta, las amenazas, la pérdida del respeto por instituciones, autoridades, conceptos académicos, etc. etc. Como resultado, tampoco raro en estos “movimientos”, renunció el Rector, y apareció otro profeta que en un acto de magia les escamoteó el control a los estudiantes y profesores, y aquello se convirtió en la lucha (otro pleito más bien) de los trabajadores por instituir el Sindicato de Trabajadores y Empleados de la UNAM (STEUNAM), a cargo del ilustre y luego casi eterno, como eran y siguen siendo los líderes sindicales mexicanos y universitarios, Evaristo Pérez Arreola. Abreviando, todo terminó con la UNAM cerrada por varios meses por los empleados ahora, y con la renuncia del Rector. Es curioso, el Rector González Casanova, tenía cierta simpatía hacia el movimiento que le costó la Rectoría, pero más asombroso es que en el “movimiento”, de 2000, seguía manteniendo esta posición, entre mediadora, tímida, y tal vez de simpatía hacia estas las monstruosidades contra la UNAM.

El Centro y el Instituto de Fisiología Celular

Había pues dos grupos académicos, uno en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, “el nuestro”, dirigido desde 1957 por el Dr. Laguna como Jefe, y otro en el Departamento de Biología Experimental del Instituto de Biología, dedicado a la neuroquímica, bajo la guía del Dr. Guillermo Massieu.

El grupo del Dr. Massieu correspondía al de un académico “puro”, que estableció un grupo de neuroquímica. El sistema era de disciplina y enseñanza, con proyectos bien definidos y dirigidos por él, pero a cargo de jóvenes brillantes y dedicados, entre los que destacaba desde luego Ricardo Tapia. Era un verdadero grupo académico, productivo, organizado para investigar y publicar alrededor del metabolismo y acciones de los aminoácidos en el cerebro. El grupo estaba incrustado dentro de otro más grande, con áreas diversas de trabajo y un enfoque académico muy distinto de los demás miembros del Departamento. Sin embargo, el Dr. Massieu fue pronto llamado a ocupar la Dirección de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y luego la Dirección General del Instituto Politécnico Nacional y del CINVESTAV; por lo que quedó como jefe Ricardo Tapia.

Nuestro grupo estaba a cargo de los Dres. José Laguna como Jefe, y Jesús Guzmán, padres académicos que además sabían y resolvían casi todo. Su característica principal era disciplina y gusto por el trabajo, con una gran, tal vez demasiada libertad académica.

Fue Marietta Tuena el eslabón primero que se estableció con el grupo de Massieu, en los términos ya descritos atrás. Sin duda que el contacto académico, la amistad de Laguna, Guzmán, Massieu, Soberón, Córdoba, Ondarza y otros, llevó a que se instituyeran seminarios conjuntos con los de Biología, que fueron también el inicio de una amistad personal. Compartíamos también el entusiasmo por el trabajo, y como complemento se abrió aquel posgrado extraoficial, a base de cursos por acá y por allá, de cursillos de visitantes extranjeros y de visitas al extranjero a los laboratorios de los

amigos de nuestros maestros. El posgrado no se aprobó sino hasta 1969, cuando ya todos éramos profesores de tiempo completo, de la Facultad nosotros, y Tapia y Miguel Pérez de la Mora, investigadores en el Instituto de Biología. Empezaban también sus carreras Graciela Meza, Rocío Salceda y Ana María López Colomé, y Herminia Pasantes hacía un doctorado en Estrasburgo.

En parte por la amistad, durante la huelga de 1972, nos reuníamos en nuestras casas, más para matar el tiempo que otra cosa. Obró la circunstancia de que en la Facultad no nos dejaban entrar a nuestros laboratorios, pero sí a los del Instituto de Biología, de modo que en parte bajo la influencia de algunas libaciones, consideramos que al terminar la huelga deberíamos establecer un centro de investigación, de preferencia en provincia. Hasta pensamos el nombre: Centro de Biología Experimental.

Todo pasó, como siempre; regresamos a trabajar, lo único que sabíamos hacer y nos interesaba; qué centro ni qué centro. El Dr. Soberón fue nombrado Rector e investido en el estacionamiento de la Facultad, ante nuestra certeza de su también locura, que ya parecía proverbial entre los bioquímicos, al aceptar tal responsabilidad en las condiciones reinantes de la UNAM. Pero también como suele suceder en estos movimientos, quedaron resentimientos de parte de los de un lado y del otro; no éramos bien vistos por los que invirtieron tanto tiempo en la política y no lograron nada, de manera que la situación no dejaba de ser incómoda. Eso es algo que todo mundo debiera, pero no parece aprender, sino muy fácilmente olvidar; los movimientos políticos en las instituciones académicas son las peores plagas que pueden aquejarlas; prestarse a ellas, además de ingenuo, es la posición más antiacadémica que se puede adoptar.

Al mismo tiempo, y precisamente con un nuevo edificio para el Instituto de Biología, se inició la construcción de la actual área de los Institutos. En este edificio, gracias a la previsión de Ricardo Tapia, se incluyó un área grande, de 20 laboratorios con espacios auxiliares, que aunque parecía exagerada, constituyó uno de los factores centrales para que ahí se estableciera un grupo mucho más grande que el ya existente.

La idea y la formación del grupo para el Centro de Fisiología Celular

Como siempre, el Dr. Laguna fue la mente clara. No obstante ser el Director de la Facultad, tomó la decisión de buscar el lugar más propicio para el grupo que tantos años le había llevado formar. Ese fue su móvil, independientemente de las consecuencias políticas que podía y llegó a tener. Llamó a su discípulo predilecto, Armando Gómez, y le dijo: “Es difícil hacer investigación en una Facultad; estoy arreglando para que se vayan al Instituto de Biología”.

Los arreglos consistieron en designar una Comisión de Reestructuración del Instituto de Biología, que consideró conveniente la incorporación de los investigadores de la Facultad de Medicina. Desde luego que ello implicaba una serie de trámites, y la anuencia del Rector, el Dr. Guillermo Soberón, pasando por el Coordinador, el Dr. Agustín Ayala, que fue siempre institucional y ejecutaba con eficiencia las decisiones del Rector, y por el Director del Instituto, que hacía otro tanto.

La verdad es que nosotros casi sólo tomamos sin chistar como buena la decisión. Al más puro estilo Laguna, no hubo consultas, ni decisiones colegiadas; simplemente encargó a Armando Gómez que formara un grupo para que se fuera al Instituto de Biología. Se hicieron previsiones, trámites de presupuestos y las transferencias de las plazas, que la Dirección del Instituto y la Coordinación de la Investigación Científica, bajo la decisión del Rector acataron. El único compromiso a cambio consistió en no dejar nuestros cursos de Bioquímica en la Facultad, que cumplimos durante muchos, muchos años. El grupo puede resumirse en una gran diversión, ambiente de mucho trabajo, un grupo que reflejaba la personalidad de Laguna, con gran visión y corazón duro; el que no trabajaba se iba.

En julio de 1973 estaba estructurado el grupo y se decidió el cambio al además primer y recién edificio construido del área actual de los institutos de la investigación científica de la UNAM.

El grupo receptor, del Departamento de Biología Experimental. Instituto de Biología, era el siguiente:

Investigadores del grupo de Neuroquímica:

- Guillermo Massieu (formador del grupo, pero ya para entonces era Director de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, y después fue Director de todo el Instituto Politécnico Nacional, ausente por lo tanto), Ricardo Tapia (quien era ya el Jefe del Departamento) y Miguel Pérez de la Mora

Técnicos o ayudantes de investigador:

- Graciela Meza, Rocío Salceda, Ana Ma. López Colomé, y Ma. Elena Sandoval

Otros investigadores y estudiantes del Departamento:

- Rafael Villalobos Pietrini (entonces en el extranjero), Roberto Llamas, Jesús Manuel León, Beatriz Gómez Lepe, Guadalupe Palomino, Abraham Rubluo, Sandra Gómez Arroyo, Jorge Cabrera, Amelia Sámano (Comisionada en la Facultad de Medicina), y Carlos González Jarquín

Se contemplaba también ya la incorporación de Herminia Pasantes, René Drucker y Lourival Possani.

De la Facultad de Medicina nos cambiamos:

- Angel Arroyo, Edmundo Chávez, Aurora Brunner, Alfonso Cárabez, Victoria Chagoya, Armando Gómez Puyou, Edgardo Escamilla, José Luis Molinari, Antonio Peña, Enrique Piña, y Marietta Tuena

Debe notarse que en la Facultad de Medicina, con una responsabilidad enorme, Armando Gómez hizo una selección de quién se cambiaba y quién no. Esto no era posible en el Instituto de Biología, que nos recibiría con los que eran, nos gustara o no, y ello tuvo luego consecuencias importantes. La idea era distinta de lo habitual antes y ahora; Soberón preparaba, no uno, sino dos excelentes grupos, para hacerles sendos centros: el de Fijación de Nitrógeno, y el de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIFN y CEINGEBI). Laguna buscó complementar dos grupos relativamente pequeños para hacer uno más sólido.

El 15 y 16 de septiembre de 1973, para hacer menos evidente el cambio, cada quien cargó sus cosas con sus propias manos en su propio coche, y un pequeño remolque que yo tenía, para la Sorvall, la ultracentrífuga Spinco, y creo que dos espectrofotómetros. Edmundo Chávez se encargó de mantener el equilibrio de la centrífuga, aún me es fácil recordarlo trepado sobre el remolque, cuidando el equipo.

El Departamento de Biología Experimental contaba entonces con un presupuesto anual de \$35,000.00 para todo y para todos. Desde luego que entre Enrique Piña, que era el Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad y el Dr. Laguna, con algunos regateos, nos asignaron cerca de \$600,000.00. Esto abrió también la posibilidad de que el Instituto de Biología consiguiera luego mejores presupuestos para los otros departamentos (Botánica y Zoología), pero no lo entendieron, al menos de inmediato.

Todavía durante varios años, nuestro querido padre, con la sequedad que lo caracterizaba, pero con constancia, nos ayudaba aquí y allá, nos compraba algún equipo, nos asignó una secretaria y un administrador para el Departamento; nos visitaba de vez en cuando, se enteraba de nuestro trabajo, y a su estilo siempre irónico, hacía bromas sobre nuestros logros y perspectivas. Esa era la manera de conservar su relación con sus hijos, pero siempre dispuesto a ver por todos.



Grupo del Dr. José Laguna, colaboradores y alumnos.

Primera fila: Elisa Mora López, Victoria Chagoya, Marietta Tuena, Alberto Hamabata y Francisca Sandoval

Segunda fila: Edmundo Chávez, José Laguna, Sergio Estrada, Armando Gómez Puyou, Carlos Gómez Lojero.

Tercera fila: Heliodoro Celis, Jesús Guzmán, Juan C. Díaz Zagoya, Enrique Piña.

Cuarta fila: Antonio Peña y Alfonso Cárbaz.

El resto ha sido ya descrito en otra parte; luego de algunas dificultades y de mucho trabajo, con pocos medios, pero mucho entusiasmo, nuestros grupos, ahora ya como uno solo, se consolidaron, y un buen día, a partir de todos aquellos esfuerzos, de todo aquel apoyo, y la visión y propuesta directa de otro personaje, Guillermo Soberón, se creó el 11 de enero de 1979 el Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, que luego, en la sesión del Consejo Universitario del 29 de mayo de 1987, devino en el Instituto de Fisiología Celular.

Todo parece ya lejano y difuso, pero nunca deberemos olvidar que, independientemente de la participación de muchos otros personajes y circunstancias, todo fue resultado de las ideas, el apoyo, el tesón, una orientación a cada uno de nosotros basada en la disciplina y el entusiasmo por el trabajo, sin importar las condiciones. Su vida estuvo llena de acontecimientos, anécdotas, fracasos a veces, pero sobre los que triunfó. Yo me he preguntado, si con aquellos medios y en aquellas circunstancias logró lo que logró, qué no hubiera logrado si como en otros países, más avanzados, hubiera contado con un medio más propicio. No obstante, sus enseñanzas y ejemplo lograron que cinco de sus alumnos directos sean a su vez eméritos de esta Universidad; Enrique Piña de la Facultad de Medicina, y Armando Gómez Puyou, Marieta Tuena, Victoria Chagoya y quien esto escribe, del Instituto de Fisiología Celular. Nosotros y muchos más nos consideramos, como decía Doña Julieta Caldrón de Laguna, su esposa: “sus hijos fuera del matrimonio”. Para mí al menos, fue y seguirá siendo como mi segundo padre. Creo que nunca debemos olvidar que la mayor herencia que recibimos de nuestro Maestro, es la de las grandes fantasías que se volvieron realidad, del visionario: el Dr. José Laguna García. Quienes lo conocimos, llegamos a apreciar y en parte heredar sus cualidades:

- Su enorme entusiasmo, y la capacidad de disfrutar el trabajo por sí mismo.
- Su enorme disciplina para trabajar de sol a sol, poniendo el ejemplo para imponerla a sus colaboradores y alumnos.
- Su incansable actividad en la búsqueda de un fin propuesto, sin importarle, y venciendo todos los obstáculos, ni evitando acciones que parecían fuera de ninguna posibilidad de éxito.
- Su convencimiento de que sólo existen los obstáculos que cada quien se los fija en su vida.
- Su afán de perpetuar y extender sus objetivos, buscando no sólo contagiar a un número cada vez mayor de colaboradores y descendientes académicos directos, sino buscando los medios de asegurar su persistencia de unas generaciones a otras.
- Su implacable espíritu crítico, con frecuencia abierto e irónico, para muchos molesto, ante los errores, omisiones, o incapacidad de quienes le rodeaban.
- Su asombrosa agilidad mental, que le permitía responder con argumentos sólidos a favor o en contra de cualquier situación o propuesta.
- Su alegría contagiosa, a veces tan sólo de imaginar estrategias, ponerlas en práctica, y con frecuencia ver que lo que perseguía se iba logrando. Su enorme

generosidad, contrastante con las actitudes de otros líderes, de dar a diestra y siniestra, y muchas veces, obtener para otros, y no sólo para su grupo cercano los medios para lograr lo que se proponían.

Ocultaba todo esto tras de comentarios chuscos e irónicos, como si la vida fuera una broma para él y los demás, pero su amplio y pocas veces visto carisma, le daba más que la autoridad formal que la proveniente de los puestos que ocupó, una autoridad moral que pocos rechazaban, a algunos les molestaban, pero más que nada, que muy pocos universitarios han logrado.

Semblanza del Dr. Antonio Peña Díaz



Nació el 14 de febrero de 1936. Ingresó en 1954 a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y en 1960 al posgrado de Bioquímica de la Facultad de Química. Impartió clases, primero en la Escuela Nacional de Obstetricia y Enfermería y luego en la Facultad de Medicina.

En mayo de 1994, se le designó investigador emérito del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Es Premio Universidad Nacional en Investigación en Ciencias Naturales, 1995.

En marzo de 1978 fue elegido como Jefe del Departamento de Biología Experimental del Instituto de Biología y en 1979 fue nombrado director del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular (CIFC). En Junio de 1995, gracias a su productividad y desarrollo el CIFC se convirtió en el Instituto de Fisiología Celular siendo elegido como director el Dr Peña.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVI, 153 – 170, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

EVASIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR POR EL VIRUS DE PAROTIDITIS DE CEPAS VACUNALES

EVASION OF CELL RESPONSE BY MUMPS VIRUS OF VACCINE STRAINS

Nora Rosas Murrieta¹, Gerardo Santos Lopez², Julio Reyes Leyva², Irma Herrera Camacho¹

¹Lab. de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Química, Instituto de Ciencias, BUAP.

²Lab. Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS.

nora.rosas@correo.buap.mx

Resumen

Los programas de vacunación han disminuido la incidencia de parotiditis y sus complicaciones. Sin embargo, algunas cepas vacunales como Urabe AM9 se han relacionado con el desarrollo de meningitis aséptica. Se ha propuesto que esta cepa revierte al fenotipo virulento, retomando entre otras características su capacidad de inhibir la respuesta antiviral mediada por interferón. La cepa vacunal Urabe AM9 del virus de parotiditis contiene dos variantes de la proteína V: V_{WT} (de la población viral HN-A₁₀₈₁) y V_{Gly} (de HN-G₁₀₈₁). La proteína V es un factor promotor de la infección viral al evadir la respuesta celular de IFN mediante la disminución de la fosforilación de la proteína STAT1. Las variantes de la proteína V difieren en su secuencia aminoacídica y en la disposición teórica de los aminoácidos de los motivos anti-IFN: Cys y Trp. La proteína V_{Gly} difiere en los aminoácidos Gly¹⁵⁶ y Pro¹⁰³ de la proteína V_{WT} modificando la disposición de los motivos funcionales anti-IFN. El análisis del efecto de las variantes

de la proteína V sobre la muerte celular por apoptosis determinó que la proteína V_{WT} de la cepa vacunal parece tener un mejor papel modulador sobre la apoptosis y la proliferación celular respecto a la proteína V_{Gly}. Es probable que en la patogénesis del virus exista un papel mediador potencial de daño, y sea la regulación de la muerte celular programada.

Palabras clave: virus de parotiditis, IFN, proteína V, apoptosis

Abstract

Vaccination programs have decreased the incidence of mumps and its complications. However, some vaccine strains such as Urabe AM9 have been linked with the post-vaccine aseptic meningitis. This strain has been proposed that reverted to virulent phenotype because their ability to suppress the interferon-mediated antiviral response among other features. The Urabe AM9 vaccine strain of mumps virus contains two variants of the protein V: V_{WT} (of the viral population HN-A₁₀₈₁) and V_{Gly} (of HN-G₁₀₈₁). The V protein is a promoter factor of the viral infection by evasion the IFN cellular response by lowering the STAT1 phosphorylation. The V protein variants differ in their amino acid sequence and the theoretical arrangement of amino acids of the motifs anti-IFN: Cys and Trp. The V_{Gly} protein differs in the amino acids Gly¹⁵⁶ and Pro¹⁰³ of the V_{WT} protein by modifying the position of the anti-IFN motifs. The analysis of the effect of variants of the V protein on the cell death by apoptosis, was determined that the V_{WT} protein seems to have a better modulator role on apoptosis and cell proliferation with regard to protein V_{Gly}. It is likely that in the pathogenesis of the virus a role potentially mediator of damage is the regulation of programmed cell death.

Key words: mumps virus, IFN, V protein, apoptosis

INTRODUCCIÓN

La vacunación es una medida sanitaria benéfica en la prevención de enfermedades causantes de epidemias, muertes y secuelas; ha permitido la erradicación de enfermedades como poliomielitis o el control de enfermedades como tosferina, el tétanos, hepatitis B y las meningitis meningocócicas que ponen en riesgo la vida de gran parte de la población. La aplicación de vacunas en las poblaciones humana y animal de todo el planeta obliga a la caracterización exhaustiva de los componentes utilizados en la producción de las mismas así como de vacunas de nueva generación aplicando herramientas biotecnologías encaminadas al control específico y dirigido de diversas enfermedades producidas por paramixovirus como sarampión o parotiditis, las cuales impactan considerablemente la salud de los individuos, el desempeño laboral y en gran medida, la economía de los países [1,2]. La vacuna contra el virus de parotiditis es ampliamente utilizada en el esquema de vacunación de la mayor parte de los países [3]; sin embargo, la aparición de brotes epidémicos tras la aplicación de vacunas con determinadas cepas del virus ha reactivado la investigación dirigida al estudio de los mecanismos que determinen la causa del comportamiento de los virus vacunales como virus silvestres [4,5,6]. Nuestro grupo de investigación ha

planteado estudios moleculares de la cepa vacunal Urabe AM9 del virus de parotiditis y su relación con el antagonismo de la respuesta celular antiviral de IFN.

Parotiditis

La parotiditis es una enfermedad prevenible por vacunación y en México está sujeta a vigilancia epidemiológica [7], comúnmente conocida como paperas, es una enfermedad infectocontagiosa de etiología viral que se caracteriza por la inflamación de las glándulas salivares (principalmente parótidas), afecta indistintamente a hombres y mujeres aunque los más afectados son los menores de 15 años. En el 30% de los casos la infección es asintomática aunque pueden presentarse complicaciones por la diseminación del virus hacia otros tejidos tales como meningitis y encefalitis siendo raras las secuelas neurológicas permanentes [8,9].

Hasta el momento no se dispone de ningún antiviral específico para el tratamiento de la parotiditis infecciosa. En ausencia de vacunación, la incidencia anual de la parotiditis está comprendida entre 100 y 1000 casos por cada 100000 habitantes, con máximos epidémicos, en ciclos de dos a cinco años. La mayoría de los países industrializados y numerosos países en vías de desarrollo han incorporado la vacunación antiparotiditis a sus programas nacionales de inmunización, utilizándose en la mayoría de los casos la vacuna triple viral (MMR) que incluye sarampión, parotiditis y rubéola [8]. Actualmente existen diversas vacunas contra la parotiditis formuladas a partir de cepas de virus atenuados (Tabla I).

Tabla I. Cepas vacunales del virus de parotiditis

Cepa vacunal	Sustrato celular	Seroconversión	Eficacia protectora	Productor	Principal área de distribución
Jeryl-Lynn	CWE	80-100%	72.8-91%	Merck	En todo el mundo
RIT4385	CWE	96-98.1%		GlaxoSmithKline	En todo el mundo
Leningrado 3	CEF	89-90%	92-99%	Bacterial Medicine Institute, Moscú	Rusia
Leningrado-Zagreb	CEF	89-98%	92-99%	Institute of Immunology of Zagreb	Yugoslavia
Urabe AM9	EHE CEF	92-100%	54.4%- 93%	Sanofi Pasteur Biken	En todo el mundo Japón
Rubini	HDCS	NI	0-33%	Swiss Serum Institute	Discontinued
Hoshino	CEF	NI	NI	Kitasato Institute	Japón
Torii	CEF	NI	NI	Takeda Chemicals	Japón
Miyahara	CEF	NI	NI	Chem-Sero Therapeutic Research Institute	Japón
NL M-46	CEF	NI	NI	Chiba	Japón
S-12	HDCS	NI	NI	Razi State Serum and Vaccine Institute	Iran

NI, No información; CEF, fibroblastos de embrión de pollo; HEF fibroblastos de embrión humano; QEF, fibroblastos de embrión; EHE embriones de pollo; HDCS, células diploides humanas.

La introducción de vacunas basadas en virus atenuados ha reducido las complicaciones asociadas con la parotiditis [3,4]. Sin embargo, algunas de las cepas virales utilizadas en la producción de vacunas han sido asociadas con efectos adversos posteriores a la vacunación.

Vacuna Urabe AM9

La cepa vacunal Urabe AM9 del virus de parotiditis se desarrolló en 1979 en el Instituto Biken de Japón iniciando su aplicación en varios países como Japón, Francia, el Reino Unido, Bélgica, Italia y Canadá, entre muchos otros, reportándose una seroconversión del 95-97% y protección del 87-90%. Sin embargo, se detectaron brotes de meningitis aséptica post-vacunal en Canadá, Japón y Reino Unido siendo 8/500000, 100 /100 000 y 9 /100 000 el número de casos por dosis, respectivamente.

En todos se aisló el virus de saliva o de líquido cefaloraquídeo (LCR) y se estableció la asociación causal de la vacunación con la ocurrencia de invasión al sistema nervioso central (SNC) [10,11]. Esto motivó la revocación de la licencia de distribución en esos países (Canadá en 1990, el Reino Unido en 1992 y Japón, 1993) sustituyendo a Urabe AM9 por la cepa Jeryl Lynn [10]; en algunos países subdesarrollados Urabe AM9 sigue aplicándose.

En 1997, una campaña masiva de vacunación en Brasil usando la vacuna triple viral con la cepa Urabe AM9 confirmó la relación directa entre la aplicación de la cepa Urabe AM9 y el desarrollo de meningitis aséptica, observando un elevado riesgo de meningitis aséptica 3 semanas después de la vacunación, el riesgo estimado fue de 1 caso en 14000 dosis aplicadas corroborando el potencial de neurovirulencia de alguna de las variantes que constituyen la cepa vacunal [12]. La asociación de la vacuna antiparotiditis con el desarrollo de meningitis también se ha vinculado con las cepas Leningrado-3 y Leningrado-Zagreb [4,5].

En México, la vacuna contra el virus de parotiditis ingresó al Programa Nacional de Vacunación en 1997 desde entonces se utilizan principalmente las cepas Urabe AM9 y Leningrado mientras que en el sector privado se aplica la cepa Jeryl Lynn. En México, así como en otros países en vías de desarrollo no hay evidencias de una clara asociación entre la aplicación de esta cepa vacunal y el incremento de casos de parotiditis o meningitis aséptica por lo que se sigue aplicando en las campañas nacionales de vacunación.

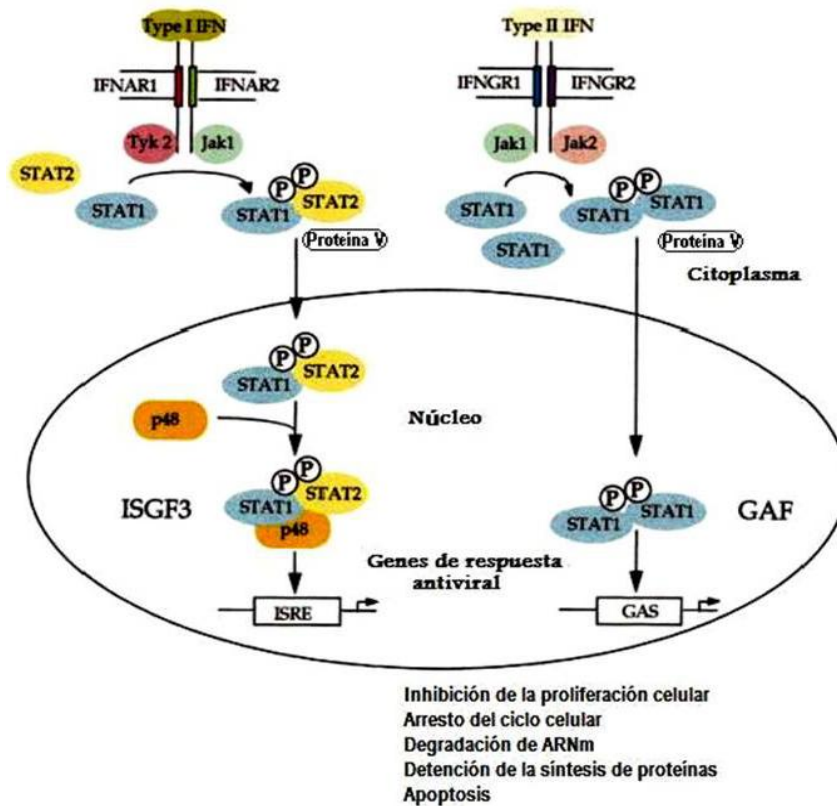


Figura 1. Vías de transducción de señales de IFN de tipo I e IFN de tipo II. La proteína V interacciona con el heterodímero STAT1-STAT2 de la vía de IFN de tipo I y con el homodímero STAT1 en la vía de IFN de tipo II. Tomado y modificado de Goodbourn et al., 2000

La asociación de la cepa vacunal Urabe AM9 con casos de meningitis aséptica posvacunal motivó a diversos grupos a iniciar el análisis molecular para establecer el mecanismo de daño en SNC. La secuenciación del gen HN (Hemaglutinina-Neuraminidasa) determinó que la cepa vacunal es una mezcla de variantes virales cuya diferencia reside en el nucleótido 1081 del gen, una variante contiene el codón AAA (genotipo HN-A₁₀₈₁) y codifica una Lys³³⁵ y la otra contiene GAA (genotipo HN-G₁₀₈₁) para dar lugar a un Glu³³⁵ [13]. En 2002, el análisis genómico de las vacunas monovalentes y trivalentes (Smith Klein Beecham) aplicadas en México mostró que la cepa Urabe AM9, contenía los dos genotipos virales [14].

La purificación y caracterización de las principales variantes mostró que la población HN-A₁₀₈₁ es la de mejor capacidad replicativa en células de origen nervioso y eficiente para afectar la transcripción de genes que participan en la defensa celular antiviral [15]. La proteína HN funciona en el reconocimiento y unión del virus al receptor celular, por lo que el éxito de la infección depende en primera instancia de su eficiente interacción. La mutación del gen HN en la población HN-G₁₀₈₁ cambió la naturaleza del grupo R del aminoácido, de Lys³³⁵ a Glu³³⁵.

Tabla II. Características generales del virus de parotiditis

<p>Estructura Virus pleomórfico con un tamaño de 100-600 nm Nucleocápside de simetría helicoidal Envoltura lipídica Con glicoproteínas que se proyectan de 12 a 15 nm de la superficie del virión</p> <p>Genoma ARN monocatenario de 15 384 b, de polaridad negativa y no segmentado Mapa genómico: 3'-NP-P-M-F-SH-HN-L-5' Nueve marcos de lectura (ORF): ORF2b y ORF2c (proteínas no estructurales) y ORF1, ORF3 al ORF7 (proteínas estructurales) Secuencia no traducida <i>leader</i> (55 nt) y una secuencia <i>trailer</i> (24 nt)</p> <p>Replicación Síntesis de un antígenoma (ARN de polaridad positiva) para la generación de los nuevos genomas</p> <p>Un promotor de la replicación situado en el extremo 5' del genoma Replicación citoplasmática con la ARN polimerasa dependiente de ARN Asociación con la proteína NP para formar la nucleocápside</p> <p>Transcripción Mecanismo de transcripción de paro e inicio Un promotor único situado en el extremo 3' del genoma</p>
--

El análisis detallado del receptor celular determinó que las células de origen nervioso son susceptibles a la infección por las dos poblaciones virales, que reconocen e interaccionan con ácido siálico en enlace α -2,6 a glicoconjugados, y aunque HN-A₁₀₈₁ exhibe una mayor afinidad al receptor las células fueron infectadas por las dos variantes [16]. La afinidad diferencial de las variantes por el receptor viral en células de origen nervioso impone una restricción para la entrada del genoma viral pero no es el único factor responsable de las diferencias replicativas observadas, las cuales podrían ser atribuidas a otro factor celular que determine la permisividad de células nerviosas a la infección por las poblaciones virales [15]. En 2009 se demostró que la diferencia en el aminoácido 335 no es un factor de virulencia en la cepa Urabe AM9 [17]; sin embargo, es necesario conocer ¿qué factores favorecen la replicación del virus de parotiditis en células de origen nervioso? y si ¿algún factor viral impide la activación del sistema de defensa celular antiviral?

Respuesta celular antiviral

Ante una infección viral las células activan la primera línea de defensa contra infecciones virales: el sistema de interferón (IFN). Los IFNs de tipo I son las principales citocinas que impiden la replicación viral mediante la vía de transducción de señales JAK-STAT (Jak1, Tyk2, STAT1, STAT2 y p48).

El mecanismo de transducción de señales es simple y la consecuencia biológica de su activación es indispensable para la supervivencia celular [18]. La vía de transducción de señales JAK-STAT inicia con la unión de IFN- α o β al receptor en cuyo

dominio intracelular están asociadas las cinasas Jak1 y Tyk2 lo que provoca su activación [19]; las enzimas fosforilan a STAT2 y STAT1, las cuales junto con la proteína IRF9 se translocan al núcleo para constituir el complejo factor de transcripción ISGF3 o factor 3 estimulado por IFN, el cual se unirá a través de IRF9, al elemento de respuesta a interferón de tipo I (ISRE) en el promotor de los genes que responden a IFN llamados genes inducidos por interferón o ISG [20] (Figura 1).

El evento final de esta vía de transducción será la inducción de la transcripción de más de 2000 genes (STAT1, STAT2, IRF9, PKR, OAS, caspasas, MHC clase I, MxA, etc.), en el caso de la línea celular de fibrosarcoma humano HT1080 IFN- α enciende 2225 genes [21], los cuales permiten una respuesta celular integral encendiendo la apoptosis, inhibiendo la proliferación celular, estimulando la respuesta celular citotóxica por linfocitos TCD8⁺, el sistema de degradación de ARNm y la detención de la traducción de proteínas cuya expresión conjunta establecerá un estado celular antiviral [18,19]. Tal respuesta es tan eficiente que los virus han desarrollado estrategias para antagonizar sus efectos antivirales, a través de proteínas cuya expresión tiene la finalidad de evadir la respuesta celular antiviral.

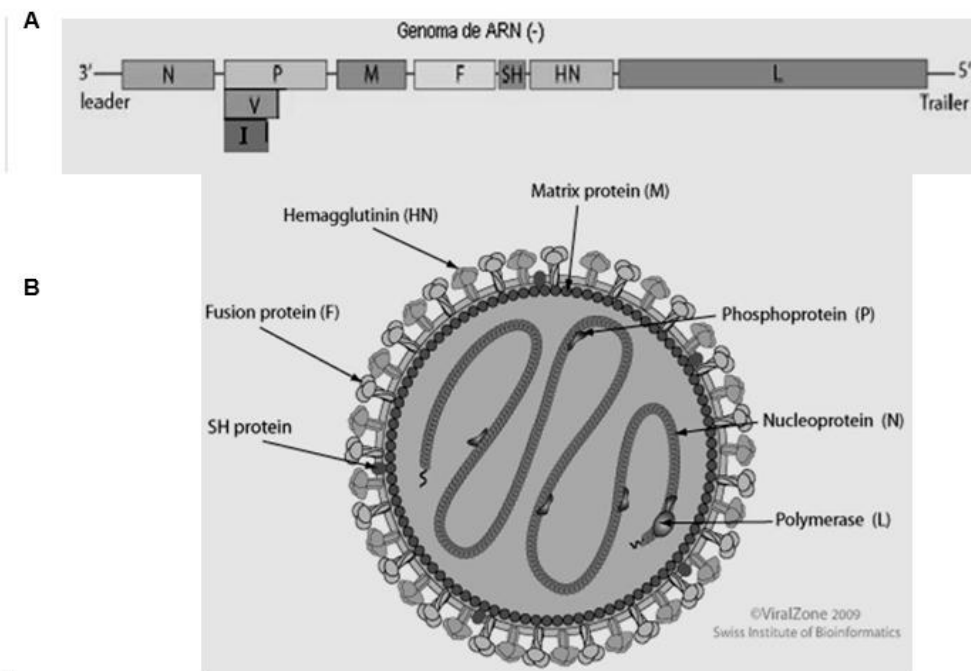


Figura 2. Representación esquemática del genoma viral y estructura del virus de parotiditis. A) Mapa genómico del MuV. B) Esquema del virión del virus de parotiditis. Tomado y modificado de ViralZone.

El virus de parotiditis pertenece al orden de los Mononegavirales, a la familia Paramyxoviridae, subfamilia Paramyxovirinae y al género Rubulavirus.^{3,9} Las características generales del VP se muestran en la tabla II, es un virus pleomórfico de

100-600 nm de diámetro, formado por una nucleocápside de simetría helicoidal, protegida por una envoltura lipoprotéica (Figura 2A). El virus de parotiditis contiene un genoma de ARN de cadena sencilla no segmentado de sentido negativo el cual codifica a nueve proteínas: NP, P (V/P/I), M, F, SH, HN y L [22,23] (Figura 2B). El gen P codifica tres proteínas: P, V e I, dos de ellas (P e I) se sintetizan a partir de marcos de lectura (ORF) sobrepuestos que se generan por un proceso de edición del ARN. Las proteínas generadas a partir del gen P se denominan V, P e I que comparten su extremo N-terminal (155 aminoácidos), las dos primeras se han detectado en células infectadas. El ARNm "P", transcrito por edición del ARN del ORF 2b, se traduce en una proteína de 391 aminoácidos que actúa como cofactor de la ARN polimerasa. El ARNm "I", producido a partir del ORF 2c genera una proteína de 170 aminoácidos cuya función no se conoce. El ARNm "V", transcrito como una copia completa del ORF P u ORF 2a (sin editar) genera una proteína de 224 aminoácidos cuya función es evadir la vía de transducción de señales de IFN [24,25] (Figura 3).

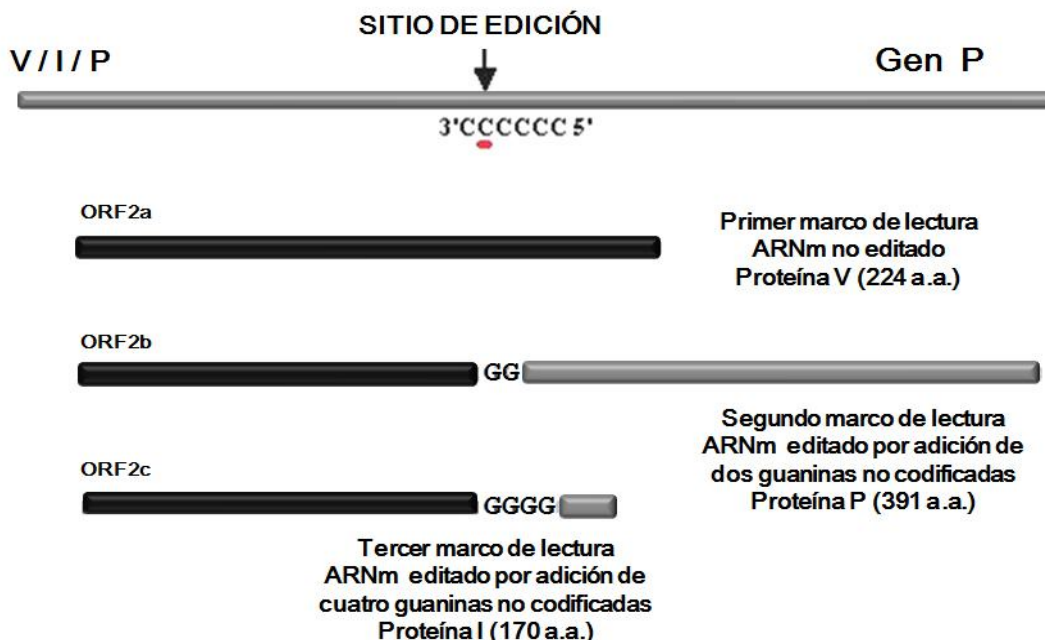


Figura 3. Representación de los ORF en el gen P del virus de parotiditis. El ARNm V es transcrito sin editar a partir del ORF 2a.

La proteína V de la familia Paramixoviridae

Diversos grupos de investigación han demostrado que los paramixovirus como el virus de parotiditis, inhiben la vía de transducción de señales de IFN. En esta vía, los factores de transcripción STAT1 y STAT2 son componentes claves. Las proteínas STATs poseen un tiempo de vida larga; sin embargo, pueden ser rápidamente degradadas durante una infección con paramixovirus mediante la expresión de la proteína V [26], que induce la degradación proteosomal de cualquier proteína STAT e interfiriendo con la activación por fosforilación de las mismas proteínas [27]. La proteína V se caracteriza por un dominio C-terminal (CTD) [27,28] altamente conservado entre

los paramixovirus (aproximadamente 50% idéntico en la mayoría de las proteínas V) el cual contiene un motivo rico en Cys (CX₃CX₁₁CXCX₂CX₃CX₂C, donde X se refiere a cualquier aminoácido) que establece una relación estequiométrica (1:2) con Zn²⁺ [28,29], tales residuos no son consistentes con dominios de unión a zinc conocidos y no hay homólogos descritos a la proteína V.

El dominio C-terminal contiene también un motivo de triptófano (Trp: W-X₃-W-X₉-W), cuya función es la interacción con las proteínas STATs [30]. En 2005 se demostró que la proteína V bloquea la vía de IFN mediante la formación de un oligómero a través del motivo de Cys, el cual expone en la superficie del mismo el motivo Trp [31]. El oligómero V es una estructura esférica indispensable para la degradación de las proteínas STATs (Figura 4).

La superficie permite a la proteína V interactuar eficientemente con proteínas celulares (DDB1, Cul4A y Roc1) y el dímero de STAT1-STAT2. La evasión de la respuesta celular antiviral por la proteína V se lleva a cabo mediante la degradación de las proteínas STAT, en el “complejo de degradación dependiente de V” (VDC) formado por la ubiquitin ligasa (E3), las proteínas DDB1 (UV-damaged DNA binding protein 1), Cul4A y STATs [31, 32]. DDB1 y Cul4A son componentes del complejo celular SCF (Skp/cullin/F-box), el cual normalmente promueve la ubiquitinación de proteínas [32]; en una infección por paramixovirus, la proteína V lo utiliza para favorecer la degradación de STATs e impedir la señalización por IFN.

Diversos análisis cristalográficos y funcionales de los componentes SCF sugieren que Cul4A interacciona con DDB1 a través de su extremo N-terminal y con Roc1 (también conocido como Rbx1) por el C-terminal, este último recluta a la enzima E2 para transferir ubiquitina a los sustratos destinados al proteasoma como ha sido claramente demostrado con el virus 5 del simio, cuya evasión de la vía de IFN ocurre por la degradación de STAT1 en complejo VDC formado por DDB1 (específicamente la subunidad p127), STAT2 y Cul4A [33]. Además de ser esencial en la inhibición de la señalización por IFN, se ha demostrado que la proteína V de SV5 impide la apoptosis [34]. En el virus de Sendai se inhibe la formación de los complejos de transcripción ISGF3 y GAF (factor activado por IFN-g) debido a la reducción de la fosforilación de la Ser⁷²⁷ de STAT [35, 36].

La proteína V del virus hPIV-2 forma un complejo en el que se asocian las proteínas STAT1 y STAT2, DDB1, p48 y DDB2 lo cual favorece la actividad de Cul4A sobre STAT2 y su degradación por el proteasoma [37, 38]. En la cepa Torri del virus de la parotiditis la proteína V induce la degradación proteolítica de STAT1 [39]. En 2005 se reportó una inhibición significativa tanto de la translocación nuclear como de la fosforilación de STAT1 y STAT2 en residuos de tirosina (Y) 701 y 689 respectivamente, a través de la asociación con la proteína RACK1 para impedir la actividad de las cinasas, sugiriendo que la proteína V podría bloquear la transducción de señales inducidas por IFN-β sin ayuda de otros componentes virales y confirmando que su CTD es esencial para dichos eventos [40].

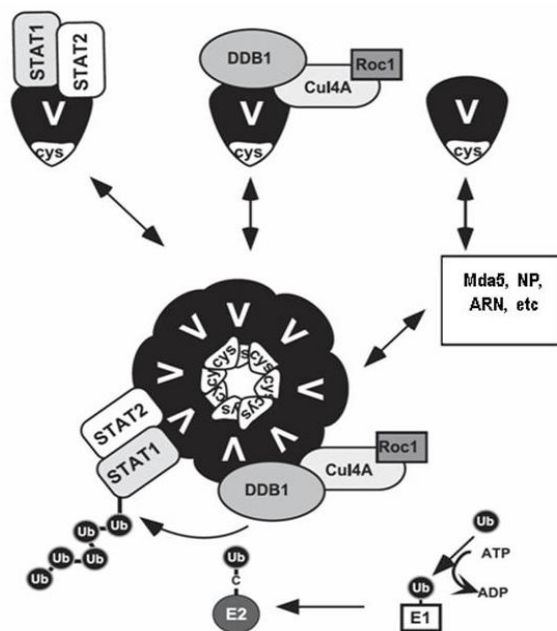


Figura 4. Modelo de interacción de la estructura y función de VDC. Interacciones adicionales (Mda5, NP, RNA, etc) mediadas por V pueden o no participar en la superestructura de VDC. Tomado y modificado de Ulane et al. 2005.

Incluso en infecciones persistentes en líneas celulares de origen linfocítico B y de leucemia crónica humana, hay degradación proteolítica de STAT1, STAT2 y p48 e inhibición de la transcripción de OAS, PKR y las moléculas de MHC de clase I [41]. En células de neuroblastoma SH-SY5Y infectadas con las dos poblaciones mayoritarias de la cepa vacunal Urabe AM9 del virus de parotiditis se demostró que existe un mayor concentración del transcrito V de la variante HN-A₁₀₈₁, el cual se correlaciona con una baja transcripción de los genes de respuesta antiviral STAT1, STAT2, IRF9 y MxA, sugiriendo que tal variante tiene una mayor capacidad de bloquear la respuesta mediada por IFN [15]. El análisis de las proteínas V mostró que difieren en su secuencia aminoacídica, la variante HN-G₁₀₈₁ llamada V_{Gly} presenta dos cambios aminoacídicos: la adición de una Gly¹⁵⁶ y Q→P¹⁰³, que no están presentes en la proteína V_{WT} (parecida a la wild type) derivada de la variante HN-A₁₀₈₁.

Los cambios aminoacídicos en la proteína V_{Gly} redistribuyen teóricamente los aminoácidos de los motivos Cys y Trp, que podrían explicar las diferentes actividades anti-IFN de las variantes de la proteína V de la cepa vacunal Urabe AM9 [42]. El análisis *in silico* realizado sugiere que, *in vivo*, la proteína V_{WT} podría ser más eficiente que la proteína V_{Gly} para asociarse con el dímero STAT1-STAT2 y probablemente para evadir la vía de transducción de señales de IFN como uno de los mecanismos para evitar la vía de defensa antiviral (Figura 5). Esta suposición se probó

experimentalmente expresando las proteínas V_{WT} y V_{Gly} en las líneas celulares HeLa y C33 de cérvix humano.

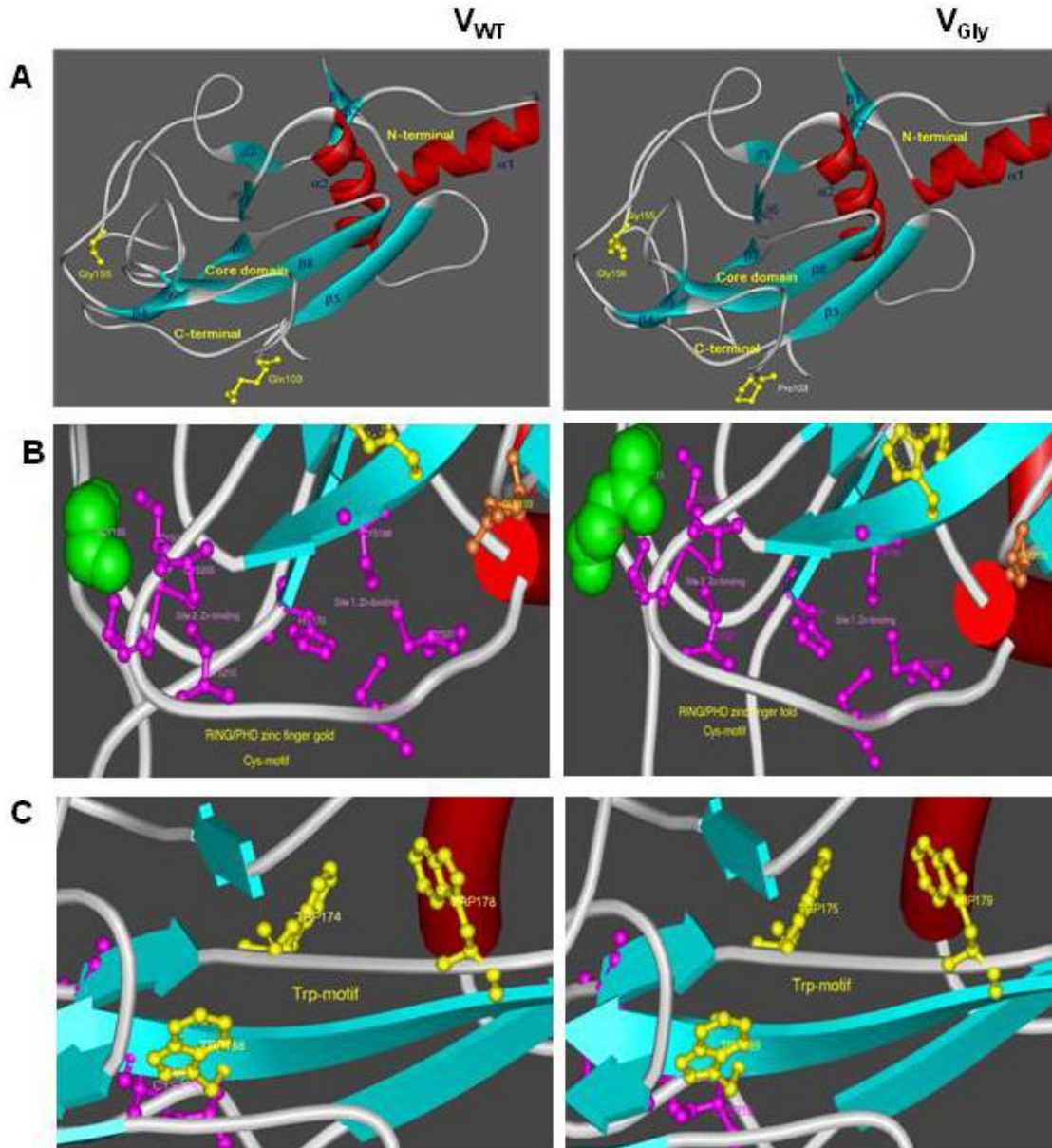


Figura 5. Modelo tridimensional de las proteínas V_{WT} y V_{Gly} . A) Modelos de la estructura 3D. B) Motivos Cys y Trp en el extremo C-terminal. Motivo rico en Cys C_4HC_3 (residuos en rosa). C) Motivo Trp de unión a STAT1-STAT2. Visualización en Web Lab Viewer

La expresión de la proteína V del virus de parotiditis disminuye el nivel de fosforilación de la proteína STAT1 [42] lo cual sugiere que la variante HN-A₁₀₈₁ de la cepa vacunal Urabe AM9 a través de su proteína V_{WT} podría ser la responsable de afectar la vía de transducción de señales de IFN pues al disminuir la concentración de

la proteína STAT1 favorece la replicación viral y probablemente el desarrollo de parotiditis o meningitis aséptica. Es claro que una infección viral exitosa depende, en parte, de la eficiencia de los mecanismos virales de inactivación de IFN así como del grado de afectación del sistema respecto al sitio específico de bloqueo de la vía de transducción de señales. La evasión de la señalización del IFN podría favorecer la inhibición de la apoptosis, alteraría el ciclo celular e impediría el estado celular antiviral [26, 27, 43].

Modulación de apoptosis

El estudio de la respuesta celular antiviral (IFN, MAPKs, apoptosis, etc.) y la proteína V del virus de parotiditis es clave para analizar a detalle las regiones de interacción de la proteína con moléculas antivirales. ¿Qué proceso celular es el que resulta más afectado ante la expresión de las proteínas V de las variantes HN-A₁₀₈₁ y HN-G₁₀₈₁ de la cepa vacunal Urabe AM9 del virus de parotiditis? El desarrollo de meningitis aséptica posterior a la vacunación con la cepa Urabe AM9 del virus de parotiditis sugiere la eficiente replicación viral y la simultánea evasión de la respuesta antiviral mediada por IFN, en la que se podría incluir a la apoptosis. La apoptosis, además de ser un mecanismo esencial para la homeostasis y supervivencia celular, es un mecanismo utilizado por diversos virus para facilitar la propagación de la infección por liberación y difusión de la progenie viral. La rapidez de la activación de la muerte celular así como la velocidad de la replicación viral son determinantes para lograr la correcta eliminación del virus o una infección viral productiva. En el mecanismo molecular que controla la apoptosis figuran las llamadas cisteinil-aspartato proteasas o caspasas.

La vía extrínseca de apoptosis o de los receptores de muerte establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de células vecinas [44]. La interacción de un ligando con el receptor de muerte activa a las caspasas iniciadoras 8 y 10 mientras que la apoptosis inducida por señales intrínsecas o apoptosis inducida por estrés, se inicia en la mitocondria con la salida de citocromo C. El citocromo C en el citosol se une al extremo C-terminal de Apaf-, el cual se oligomeriza y recluta a la procaspasa-9 (otra caspasa iniciadora) para su activación y a su vez, activa a otras caspasas. Las caspasas 8 y 9 activan a las caspasas efectoras 3 y 7. La activación secuencial de una caspasa por otra, crea una cascada expansiva de actividad proteolítica, que conlleva la digestión de proteínas estructurales en el citoplasma, la degradación del DNA cromosómico y la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Figura 6) [45].

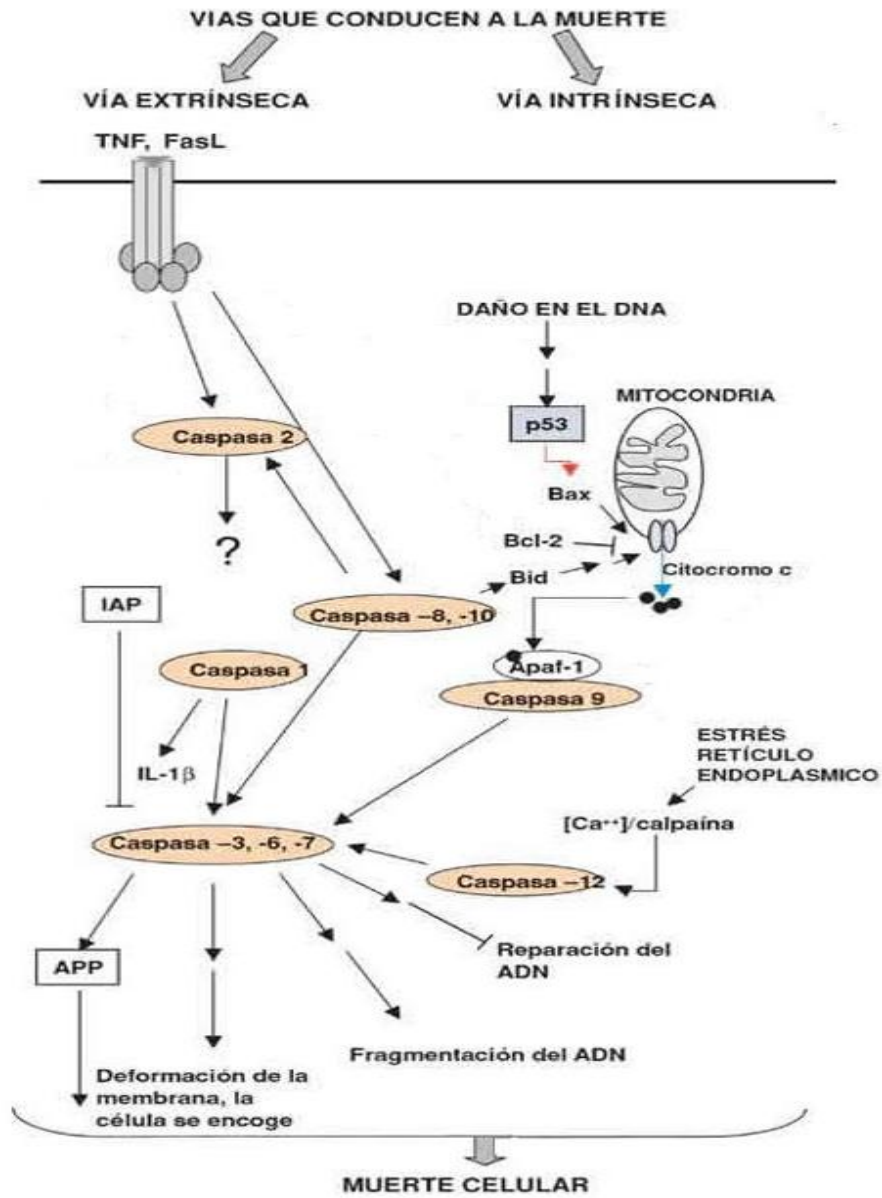


Figura 6. Vías de transducción de señales que conducen a la apoptosis o supervivencia de las células. Los estímulos que conducen a la apoptosis de la célula pueden ser intracelulares (vía intrínseca) por caspasa 9 o extracelulares (vía extrínseca) por caspasa 8.

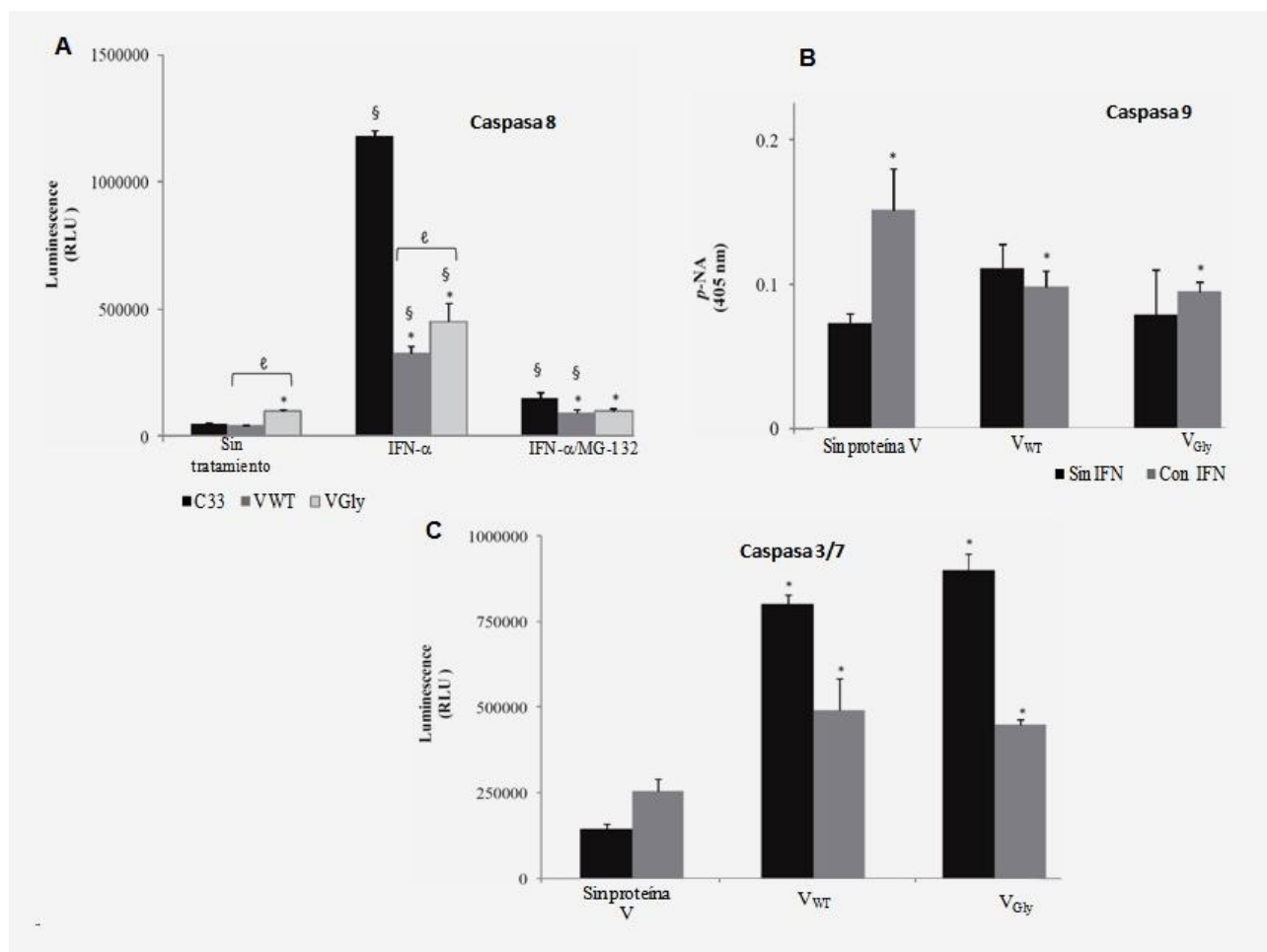


Figura 7. Actividad de caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-3/7 en la línea celular C33 de adenocarcinoma de cérvix que expresan las proteínas V_{WT} y V_{Gly} del virus de parotiditis. A) Caspasa-8 (Caspase-Glo 8 assay Promega). B) Caspasa 9 (Caspase 9 colorimetric assay BioVision). C) Caspasa 3/7 (Caspase-Glo 3/7 assay (Promega). §, diferencia estadística entre las muestras con y sin tratamiento con IFN y IFNMG132. ℓ, diferencia estadística entre muestras con V_{WT} y V_{Gly} . *diferencia estadística entre las muestras con y sin IFN. t-student ($P < 0.05$).

Se tienen evidencias de que la proteína V del virus 5 del simio [34] y la proteína C de HPIV-1 tienen la capacidad de bloquear la apoptosis inducida por IFN- α [46,47]. El conocimiento del orden de activación de caspasas o de su inhibición podría dar información de las vías usadas por un virus para modular el programa de muerte celular. En ese sentido, la proteína V del virus de parotiditis podría inhibir o regular la magnitud de la activación de la apoptosis controlando la actividad de diversas caspasas, por lo que se estudió el efecto de las proteínas V_{WT} y V_{Gly} de la cepa vacunal Urabe AM9 sobre la actividad de caspasas en una línea celular de adenocarcinoma de cérvix. El IFN- α induce apoptosis y se correlaciona con la actividad de caspasa 1, 2, 3, 8 y 9, privilegiando la ruta apoptótica extrínseca así como la activación de caspasa 8

para encender la apoptosis [48]. Recientemente encontramos que las proteínas V_{WT} y V_{Gly} de la cepa Urabe AM9 reducen la actividad, inducida por IFN- α 2b, de las caspasas iniciadoras 8 y 9 así como de las caspasas efectoras 3 y 7 y la fragmentación del ADN nuclear [49] (Figura 7).

En el sistema sin estimulación con IFN- α , se detectó una baja actividad de caspasa 8 independientemente de la expresión de la proteína V, en cambio, la estimulación con IFN- α 2b incrementó la actividad enzimática; misma que disminuyó en aquellas células que expresaron a la proteína V siendo un poco menor la actividad en células con la proteína V_{WT} (Figura 7A). El mismo patrón de actividad se registró en células que se co-estimularon con IFN- α 2b y MG-132 (inhibidor del proteosoma), aunque en esta condición la detección mostró un nivel bajo de actividad de caspasa 8 cuando se inhibió el proteosoma. Por otro lado, al evaluar la caspasa 9, que tienen un efecto sobre la apoptosis que involucra la vía intrínseca o mitocondrial se observó la escasa activación de la enzima, tanto en el control como en células que expresaron a las proteínas V (Figura 7B), es decir, el tratamiento con IFN- α 2b no activó fuertemente la ruta apoptótica mitocondrial y aunque se observó un ligero incremento de la actividad en células que expresan V_{WT} no es posible afirmar que ante la presencia de las proteínas virales en estudio, se abate la actividad de caspasa-9.

Las caspasas 8 y 9 son directamente responsables de la activación de las caspasas efectoras 3 y 7, las cuales podrían ser blanco de la regulación por las proteínas V. Cuando el sistema se estimuló con IFN- α 2b, hubo actividad de las caspasas 3 y 7 en células que expresaron o no a las proteínas virales (Figura 7C). La comparación detallada de la actividad de las caspasas con y sin IFN mostró que las proteínas V inhiben parcialmente la actividad, aunque no hubo diferencia sobre la actividad enzimática entre ambas proteínas. Sobre la base de los resultados obtenidos, hay un claro indicio de que las proteínas V del virus de parotiditis regulan la extensión del proceso apoptótico [49]. En otros virus de la familia Paramixoviridae tales como el virus de sarampión, SV5 y el virus de Sendai se ha demostrado su efecto sobre la apoptosis mediante la activación de caspasa 8, caspasa 3 y 7 [34,46,50]. La proteína V_{WT} de la cepa vacunal Urabe AM9 del virus de parotiditis parece regular la apoptosis y la proliferación celular; sin embargo, el mecanismo detallado de la ejecución de tal actividad no se conoce; la identidad de las caspasas inducidas o inhibidas por algún factor en la infección del virus de parotiditis es importante para establecer el mecanismo molecular del virus en la intervención del proceso apoptótico.

Conclusiones

En el estudio de los factores virales y celulares implicados en el desarrollo de meningitis aséptica por la cepa vacunal Urabe AM9 del virus de parotiditis, se han encontrado claras evidencias respecto a que la proteína V_{WT} de la cepa vacunal es clave en la evasión de la respuesta celular antiviral. Los datos sugieren que los cambios estructurales teóricos en la proteína V_{Gly} por reacomodo de asas y residuos en los motivos Cys y Trp, son responsables de la pérdida de la eficacia en la inducción de la degradación de las proteínas STAT1 y STAT2, viéndose reflejado en las diferencias que se encuentran en la replicación y transcripción de genes en respuesta a interferón

durante infecciones con tal variante HN-G₁₀₈₁. Adicionalmente la proteína V_{WT} parece ser un modulador de la apoptosis y la proliferación celular, es probable que en la patogénesis del virus un rol potencialmente mediador de daño sea la regulación de la muerte celular programada cuyo conocimiento podría sugerir probables blancos del desarrollo de antivirales específicos contra el virus de parotiditis.

Referencias

1. Zhou, W., Pool, V., Iskander, J. K., English-Bullard, R., Ball, R., Wise, R. P., Haber, P., Pless, R. P., Mootrey, G., Ellenberg, S. S., Braun, M. M. y Chen, R.T. (2003) *MMWR Surveill Summ* **52**: 1-24.
2. Meeusen, E. N. T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P. P. y Jungersen, G. (2007) *Clinical Microbiology Rev* **20**: 489–510.
3. Galazka, A. M., Robertson, S. E. y Kraigher, A. (1999) *Bull World Health Organization* **77**: 3-14.
4. World Health Organization. (2007) *Weekly epidemiological record* **82**, 49–60.
5. Deeks, S. L., Lim, G. H., Simpson, M. A., Gagné, L., Gubbay, J., Kristjanson, E., Fung, C. y Crowcroft, N. S. (2001) *Canadian Medical Association Journal* **183**: 1014–1020.
6. Hughes, A. L. (2009) *Vaccine* **27**: 1685–1690.
7. Wolinsky, J. S. (1996) *Fields Virology 3a edition*, Fields BN, Knipe DM, Howly PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (Eds). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
8. Plotkin, S. A. (2004) *Vaccines Fourth edition*, S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, P. A. Offit (Eds). WB Saunders, Philadelphia.
9. Kepa, L., Oczko-Grzesik, B., Stolarz, W. y Sobala-Szczygieł, B. (2002) *Przegl Epidemiol* **56**: 391-8.
10. Brown, E. G. y Wright, K. E. (1998) *Reviews in Medical Virology* **8**, 129-142.
11. Cusi, M.G., Santini, L., Bianchi, S., Valassina, M. y Valensin, P.E. (1998) *Journal Clinical Microbiology* **36**: 3743-3744.
12. Dourado, I., Cunha, S., Teixeira, M.G., Farrington, C.P., Melo, A., Lucena, R. y Barreto, M. L. (2000) *Am Journal Epidemiology* **151**: 524.-530.
13. Wright, K. E., Dimock, K. y Brown, E. G. (2000) *Virus Research* **67**: 49-57
14. Santos-López, G., Cruz-Cruz C, Pazos, N., Vallejo, V., Reyes-Leyva, J. y Tapia-Ramirez, (2006) *Microbes Infection* **332**: 332-339.
15. Rosas-Murrieta, N., Herrera-Camacho, I., Vallejo-Ruiz, V., Millán-Pérez, L., Cruz, C., Tapia-Ramírez, J., Santos-López, G. y Reyes-Leyva, J. (2007) *Microbes Infection* **9**: 864-872.
16. Reyes-Leyva, J., Baños, R., Borraz-Argüello, M., Santos-López, G., Rosas, N., Alvarado, G., Herrera, I., Vallejo, V. y Tapia-Ramírez, J. (2007) *Microbes Infection* **9**: 234-40.
17. Sauder, C. J., Zhang, C. X., Link, M. A., Duprex, W. P., Carbone, K. M. y Rubin, S. A. (2009) *Vaccine* **27**: 5822-5829.
18. Goodbourn, S., Didcock, L. y Randall, R. E. (2000) *Journal General Virology* **81**: 2341-64.
19. Randall, R. E. y Goodbourn, S. (2008) *Journal General Virology* **89**: 1-47.

-
20. Goodbourn, S. y Randall, R. E. (2009) *Journal Interferon Cytokine Research* **29**: 539-547.
 21. Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. y Silverman, R. H. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15623-15628.
 22. Carbone, K. M. y Rubin, S. (2007) Mumps virus. In: *Fields Virology*, 5th Edition (Editors: Knipe, David M.; Howley, Peter M.). Vol. I, sección II. pp 1528-1551
 23. Lamb, R. A. y Parks, G. D. (2007) Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*, 5^a edition (Editors: Knipe DM, Howley PM.). Vol. I, sección II. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. pp 1450- 1497.
 24. Vidal, S., Curran, J. y Kolakofsky, D. (1990) *EMBO Journal* **9**, 2017-22.
 25. Hausmann, S., Garcin, D., Delenda, C. y Kolakofsky, D. (1999) *J Virol* **73**: 5568-76.
 26. Gotoh, B., Komatsu, T., Takeuchi, K. y Yokoo, J (2002) *Rev Medical Virology* **12**: 337-357.
 27. Young, D. F., Didcock, L., Goodbourn, S. y Randall, R. E. (2000) *Virology* **269**: 383-90.
 28. Liston, P. y Briedis, D. J. (1994) *Virology* **1**: 399-404.
 29. Paterson, R. G., Leser, G. P., Shaughnessy, M. A. y Lamb, R. A. (1995) *Virology* **208**: 121-31.
 30. Nishio, M., Tsurudome, M., Ito, M., Garcin, D., Kolakofsky, D. y Ito, Y. (2005) *J Virol* **79**: 8591-8601.
 31. Ulane, C. M., Kentsis, A., Cruz, C. D., Parisien, J. P., Schneider, K. L. y Horvath, C. M. (2005) *J Virol* **79**: 10180-10189.
 32. Ulane, C. M. y Horvath, C. M. (2002) *Virology* **304**: 160–166.
 33. Lin, G. Y., Paterson, R. G., Richardson, C. D. y Lamb, R. A. (1998) *Virology* **249**: 189–200.
 34. Sun, M., Rothermel, T. A., Shuman, L., Aligo, J. A., Xu, S., Lin, Y., Lamb, R. A. y He, B. (2004) *J Virol* **78**: 5068-5078.
 35. Kato, A., Kiyotani, K., Sakai, Y., Yoshida, T., Shioda, T. y Nagai, Y. (1997) *J Virol* **71**: 7266-72.
 36. Huang, C., Kiyotani, K., Fuji, Y., Fukuhara, N., Kato, A., Nagai, Y., Yoshida, T. y Sakaguchi, T. (2000) *J Virol* **74**: 7834–7841.
 37. Parisien, J. P., Lau, J. F., Rodríguez, J. J., Ulane, C. y Horvath, C. M. *J Virol* (2002) **76**: 4190–4198.
 38. Andrejeva, J., Young, D. F., Goodbourn, S. y Randall, R. E. (2002) *J Virol* **756**, 2159–2167.
 39. Yokosawa, N., Kubota, T. y Fujii, N. (1998) *Archives Virology* **143**, 1985-1992.
 40. Kubota, T., Yokosawa, N., Yokota, S. y Fujii, N. (2002) *Journal Virology* **76**: 12676-12682.
 41. Fujii, N., Yokosawa, N. y Shirakawa, S. (1999) *Virus Research* **65**: 175-185.
 42. Rosas-Murrieta, N. H., Herrera-Camacho, I., Palma-Ocampo, H., Santos-López, G. y Reyes-Leyva, J. (2010) *J Virol* **7**: 263-272.
 43. Benedict, C. A., Norris, P. S. y Ware, C. F. (2002) *Nat Immunol* **3**: 1013–1018.
 44. Moffitt, K. L., Martin, S. L. and Walker, B. (2010) *J Pharm Pharmacol* **62**: 563–576.
 45. Moffitt, K. L., Martin, S. L. and Walker, B. (2010) *J Pharm Pharmacol* **62**: 547–562.

46. Schaap-Nutt, A., D'Angelo, C., Scull, M. A., Amaro-Carambot, E., Nishio, M., Pickles, R. J., Collins, P. L., Murphy, B.R., Schmidt, A.C. (2010) *Virology* **397**: 285-98.
47. Bartlett, E.J., Cruz, A. M., Esker, J., Castano, A., Schomacker, H., Surman, S. R., Hennessey, M., Boonyaratanakornkit, J., Pickles, R. J., Collins, P. L., Murphy, B. R. y Schmidt, A. C. (2008) *Journal Virology* **82**: 8965–8977.
48. Thyrell, L., Erickson, S., Zhivotovsky, B., Pokrovskaja, K., Sangfelt, O., Castro, L., Einhorn, S. y Grandér, D. (2002) *Oncogene* **21**: 1251–1262.
49. Rosas-Murrieta, N. H., Santos-López, G., Reyes-Leyva, J., Sosa-Jurado, F. y Herrera-Camacho, I. (2011) *Virology Journal* **8**: 224-230.
50. Wiegand, M., Bossow, S. y Neubert, W. J. (2005) *Journal General Virology* **86**: 2305–2314.

Semblanza de la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta

La Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta se graduó de la Universidad de Puebla (BUAP) en 1998 en la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo, obtuvo su doctorado en el Posgrado en Ciencias Químicas de la BUAP en 2007 e ingresó al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química en el Instituto de Ciencias de la BUAP como profesora-investigadora de tiempo completo en junio del mismo año. La línea de investigación de la Dra. Rosas se centra en el estudio de proteínas del virus de parotiditis y la respuesta celular antiviral.





Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXVI, 171 – 199, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

AGENTES Y MECANISMOS NEUROPROTECTORES RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDANTE EN EL INFARTO CEREBRAL.

AGENTS AND NEUROPROTECTOR MECHANISMS RELATED TO OXIDATIVE STRESS IN BRAIN STROKE.

Araceli Díaz-Ruiz y Camilo Rios

Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez S.S.A., México

Resumen

Las enfermedades cerebro vasculares son padecimientos de consecuencias altamente discapacitantes y devastadoras, se calcula que existen alrededor de 5.5 millones de muertes cada año y 44 millones de personas viven con una discapacidad asociada con esta enfermedad, así mismo se estima que esta cifras van en aumento, debido a que en la mayoría de los casos este padecimiento está asociado con el envejecimiento. En México se ha reportado una tendencia similar, en el año 2000 las enfermedades cerebro vasculares estaban consideradas como la cuarta causa de de muerte en la población adulta con 25 357 defunciones, mientras que en el 2010 estas enfermedades ocuparon el tercer lugar de muertes con 32,306. La consecuencia sobre la función neurológica tiene un gran impacto social, al ser la primera causa de discapacidad en el mundo. De acuerdo con los eventos de daño ocurridos a lo largo del tiempo, se observa de manera inicial una la falla energética generada por la

interrupción del aporte de oxígeno y glucosa, la excitotoxicidad que es el incremento de neurotransmisores excitatorios como el glutamato en el espacio extracelular, el daño oxidativo que se produce por la excesiva cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno presentes en el tejido nervioso, la respuesta inflamatoria que se inicia como consecuencia de la ruptura de la barrera hematoencefálica, estos eventos de daño agudo activan las señales de muerte celular programada denominada apoptosis. Para revertir este proceso, se han desarrollado estrategias neuroprotectoras que intentan regular o detener los principales mecanismos de daño celular. Actualmente existen diversas propuestas terapéuticas probadas a nivel experimental y clínico cuyos resultados no han sido exitosos a pesar de observar mejoría funcional, la razón de este fracaso, radica en metodologías poco reproducibles e inadecuadas o por ser tratamientos con ventanas terapéuticas muy estrechas que las hacen poco factibles para ser usadas en la clínica.

Palabras clave: Infarto cerebral, fisiopatología y neuroprotección.

Abstract

Cerebrovascular diseases are disabling conditions with devastating consequences. It is estimated that there are about 5.5 million deaths annually and 44 million people living with a disability associated with this condition. These figures are increasing, because in most cases this condition is associated with aging. Mexico has reported a similar trend. In 2000, cerebrovascular diseases were considered as the fourth leading cause of death in the adult population with 25,357 deaths, while in 2010 these diseases ranked third with 32,306 deaths. The effect of brain ischemia on neurological function has great social impact, being the leading cause of disability, worldwide. According to the damaging events occurring over time, damage initiates with an energetic failure caused by the interruption of oxygen and glucose. Excitotoxicity takes place as an increased excitatory neurotransmitters release, (glutamate, aspartate) toward the extracellular space. The oxidative damage that is caused by excessive amounts of reactive oxygen and nitrogen species and the inflammatory response initiated as a result of the blood-brain barrier breakdown, trigger acute injury death signals called cell apoptosis. To prevent this process, neuroprotective strategies have been developed that attempt to regulate or stop the main mechanisms of cellular damage. Currently, there are several therapeutic approaches tested on experimental and clinical settings. However, results have not been successful to date

Key words: cerebrovascular accident, physiopatology, neuroprotection

ANTECEDENTES

Epidemiología de infartos cerebrales

En todo el mundo ocurren 56 millones de defunciones cada año, de éstas 5.5 millones son atribuidas a las enfermedades cerebrovasculares lo que representa la segunda causa de muerte global en la población adulta [1]. Incluida en estas enfermedades se encuentra el infarto cerebral (IC) que es considerado el padecimiento más devastador de las enfermedades neurológicas y se estima que es la tercera causa de enfermedades en el mundo y la primera en discapacidades [2], se calcula que 16 millones de personas sufrieron de un IC por primera vez en el año 2005 y se reporta una prevalencia de 62 millones de sobrevivientes [3]. Por otra parte, los datos epidemiológicos dados a conocer en 2001 en los Estados Unidos indican que las enfermedades cerebrovasculares ocupan la tercera causa de muerte con una incidencia reportada de 795 mil infartos cada año de los cuales 600 000 son primeros episodios es decir, se presentan 269 nuevos casos por cada 100,000 habitantes [4]. Este padecimiento además de tener implicaciones graves para la salud también genera elevados costos ya que la atención a los sobrevivientes de accidentes cerebrovasculares tuvo un costo estimado de \$ 18.8 mil millones de dólares durante el año 2008 y pérdidas en productividad y mortalidad prematura con un costo adicional de \$ 15,5 mil millones [5].

Los registros de la incidencia en los países europeos, fueron reportados en el 2009, para la población adulta de Francia (Dijon), Italia (Sesto Fiorentino), Lituania (Kaumas), Reino Unido (Londres), España (Menorca) y Polonia (Warsaw), en este estudio se reportaron 2129 nuevos casos de IC con un valor promedio de edad de 73 años, de los cuales el 51 % de los eventos fueron mujeres [6], para los varones la mayor incidencia se presentó en Lituania y la menor en Italia y España, mientras que para las mujeres el fenómeno fue similar, solo Polonia fue agregada como un país de alta incidencia, finalmente los datos globales indican que el promedio general fue de 101.2 nuevos casos por cada 100 000 habitantes. Con respecto a la incidencia de IC en los países del sur de Asia se reportaron entre 45 y 471 nuevos casos por cada 100 000 habitantes, siendo la población urbana la más vulnerable [7], sin embargo China no cumple con esta tendencia ya que, del total de muertes que se presentan anualmente el 28.8% corresponden a la población urbana y 29.1 % a la población rural, con respecto a la población de la India la estimación total fue del 16.4 % [8]. En algunos países de América Latina el porcentaje de fallecimientos asociados a enfermedades cerebrovasculares son: para Cuba 18.9 %, en la República Dominicana 23.4 %, para la población urbana de Perú es de 28.6% y para la población rural se estima en 13.7 %, en Venezuela la incidencia global fue del 15.2 %, finalmente en la población urbana de México se reportó un 14.9% y el rural 7.2 % [8]. Por último de acuerdo con datos publicados por la Secretaría de Salud y el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) la incidencia de fallecimientos asociados a los eventos cerebrovasculares se incrementaron, pasando de 25 357 en el año 2000 a 32,306 en el 2010.

Tipos de infartos

Trombosis

La aterosclerosis es la característica patológica más común de las enfermedades vasculares que resulta en la obstrucción del vaso sanguíneo y representa aproximadamente el 85% de todos los accidentes cerebrovasculares. Las placas ateroscleróticas pueden sufrir cambios patológicos, como úlceras, trombosis y calcificaciones intra-placa hemorrágica. La susceptibilidad de la placa de ulcerarse depende de su estructura, de su composición y de su cohesión. La alteración del endotelio inicia con un complicado proceso que activa muchas enzimas que llevan a la adhesión y agregación de las plaquetas a la pared vascular, formando pequeños acúmulos de plaquetas y fibrina [9]. Otro tipo de infarto es el lacunar que se producen como consecuencia de la oclusión de las arterias penetrantes profundas, el tamaño de un infarto lacunar es inferior a 20 mm y la incidencia de este tipo de infartos es de un 10-30%, esta incidencia depende de la raza así como de las enfermedades presentes en los individuos como es la hipertensión preexistente y la diabetes mellitus. Bajo estas condiciones las arteriolas pequeñas se alargan, se vuelven tortuosas y presentan micro-aneurismas que son susceptibles a la oclusión por micro-trombos y es causada principalmente por la hipertensión crónica [10]. Por otra parte el infarto cerebrovascular embólico se produce por la interrupción del flujo sanguíneo a consecuencia de un coágulo de fibrina o por fragmentos de la placa de ateroma que se desprenden. Otro tipo de infarto embólico puede ser el provocado por una burbuja de aire generada a consecuencia de una neurocirugía, otorrinolaringología o por un procesos de anestesia en el cual se realiza una cateterización venosa central, así como por cirugía de heridas penetrantes en el pecho o en el caso de buceadores el barotrauma [11]. Otro tipo de accidente cerebro vascular isquémico es el hipotensos-global que puede ser causado por cambios hemodinámicos especialmente en regiones con suministro de sangre marginal resultante de estenosis del vaso o disminución de la presión arterial [12].

Los síntomas clínicos

Los síntomas durante la etapa aguda del IC son: debilidad en las extremidades, déficit en la sensibilidad, parálisis facial, ataxia, disfagia, problemas del habla (afasia o disfasia) o alteraciones visuales. El grado de afección es comúnmente evaluado por medio de la escala modificada de Rankin y con la escala de los Institutos Nacionales de Salud Stroke Scale (NIHSS por sus siglas en ingles).

Factores de riesgo

Los factores de riesgo asociados con el IC se muestran en la tabla 1. En general se pueden clasificar en tres grupos, dependiendo de si pueden ser o no modificados:

- a) No modificables: son los factores que no pueden ser modificados debido a que están determinados por la propia persona.
- b) Modificables bien establecidos: son aquellos factores de los que se conoce y se ha demostrado que tienen un nivel de evidencia, grado de asociación y riesgo relativo a padecer infarto cerebral.
- c) Modificables potenciales: son aquellos que pueden ser altamente modificables.

Tabla 1. Factores de riesgo para el infarto cerebral.

FACTORES DE RIESGO PARA EL INFARTO CEREBRAL

No modificables	Modificables bien establecidos	Modificables potenciales
<ul style="list-style-type: none">- Edad- Sexo- Herencia- Raza- Geografía- Clima	<ul style="list-style-type: none">- Hipertensión arterial- Cardiopatías de alto riesgo embolígeno- Marcadores de aterosclerosis- Diabetes mellitus- Ataque isquémico transitorio	<ul style="list-style-type: none">- Dislipemias- Tabaquismo- Alcoholismo- Obesidad- Sedentarismo- Estrés- Cardiopatías de bajo-medio riesgo embolígeno- Otros: anticonceptivos orales, migraña, etc.

Entre los factores de riesgo no modificables se incluyen: la edad avanzada, frecuentemente en personas mayores de 65 años, generalmente se presenta en el género masculino y en razas no blancas [13]. El IC se puede prevenir corrigiendo el estilo de vida, modificando la dieta, mejorando la actividad física, disminuyendo el consumo de alcohol, evitando el consumo de tabaco y reduciendo el estrés [14].

Fisiopatología del Infarto Cerebral

La isquemia cerebral puede ser el resultado de diversas alteraciones que disminuyen el flujo sanguíneo cerebral y como consecuencia producen privación de oxígeno y glucosa. Las células en el centro del foco isquémico son especialmente vulnerables y mueren a los pocos minutos del inicio del evento. Las células con una perfusión sanguínea a una tasa menor de 12ml/100g/min. también están destinadas a morir y conforman el centro isquémico. El área de penumbra representa un margen de tejido viable hipoperfundido a una tasa de 15-18ml/100g/min. su supervivencia es de aproximadamente 6 horas y pueden ser potencialmente rescatables [15, 16, 17], sin embargo, esta ventana terapéutica puede variar dependiendo del tipo celular ya que algunas células pueden morir en pocos minutos después de la isquemia [18]. Las células localizadas en la zona de penumbra, desencadenan una serie de mecanismos autodestructivos que se inician a consecuencia del evento isquémico y que pueden llevarlas a la muerte o a la supervivencia por tiempo limitado, sin embargo, la vulnerabilidad de las células depende del tipo de receptores localizados en la

membrana plasmática, las conexiones celulares, las propiedades neuroquímicas y la exposición a factores de crecimiento [19] Figura 1.

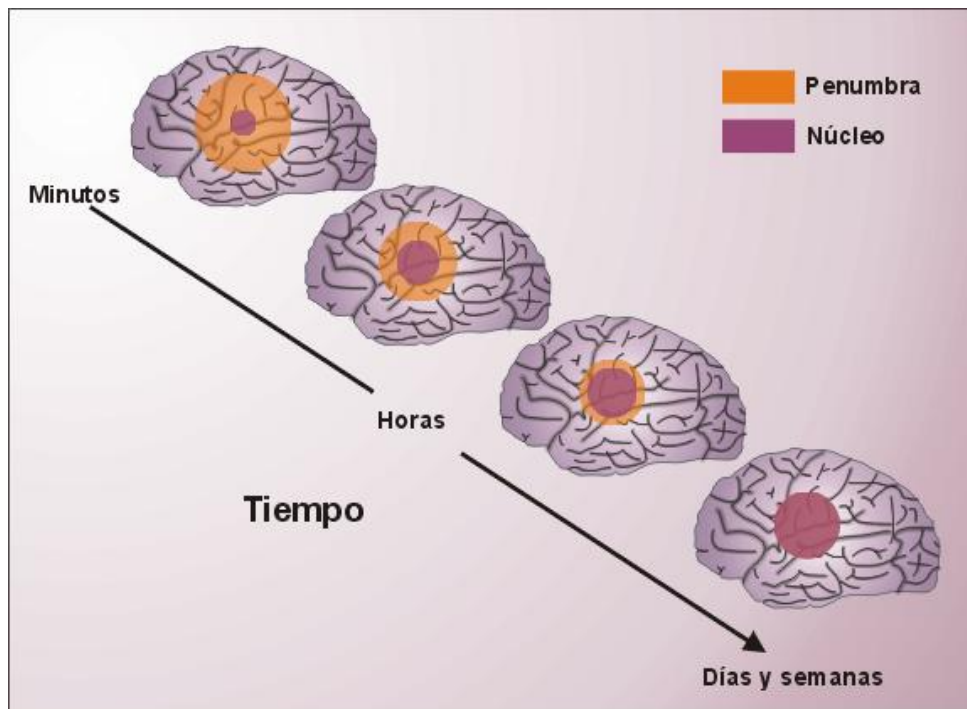


Figura 1. Imagen que muestra el incremento en la zona de lesión a lo largo del tiempo (Esquema modificado de Baird et al 1997) [22].

Durante los primeros minutos del evento isquémico se reduce rápidamente la síntesis de ATP una molécula altamente energética e indispensable para el funcionamiento de diversas proteínas, enzimas, bombas, etc. La falta de ATP durante esta etapa provoca que, la bomba de sodio-potasio ATPasa, no pueda mantener el gradiente electroquímico de la membrana plasmática y se despolarice, lo que conduce a la liberación de glutamato y a la apertura de canales dependientes de voltaje. Esto permite un incremento en el calcio citosólico asociado con la activación de μ -calpaina, calcineurina y fosfolipasas con una proteólisis subsecuente de sustratos de calpaina, activación de sintasa de óxido nítrico constitutiva y formación de ácido araquidónico. Otros mecanismos involucrados en la isquemia son los mediados por inflamación y apoptosis. La mayor parte del daño tisular observado después de la isquemia es producto de la reperusión secundaria observándose destrucción neuronal desde las 6, 24 y 48h posteriores a la isquemia [20]. Por otra parte, existen mecanismos autoprotectores inducidos por el daño cerebral como la formación de proteínas de choque térmico, citocinas antiinflamatorias, factores de crecimiento y antioxidantes endógenos, el balance entre mecanismos de daño y de protección determinará el destino del tejido isquémico [21, 17] Figura 2.

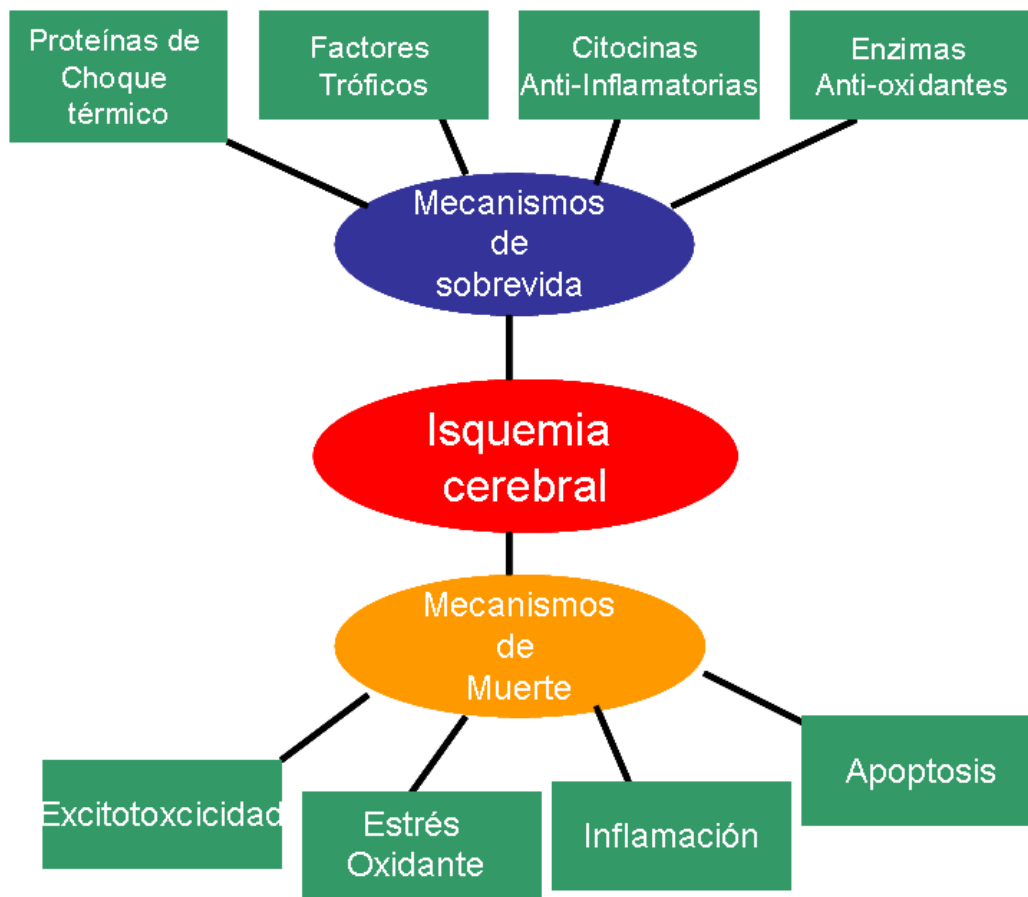


Figura 2. Imagen en la que se ilustran los principales mecanismos de sobrevida y de muerte celular que se desarrollan durante la etapa aguda después de una Isquemia cerebral (modificado de Leker y Shohami. 2002) [16].

Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es el término empleado para describir la liberación de glutamato de manera incontrolada al espacio extracelular. La falla energética que se presenta en los primeros minutos del evento isquémico originada a su vez por la falta de oxígeno y glucosa generan la despolarización de la membrana plasmática dando como resultado la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje, que activan la liberación de glutamato al espacio extracelular. En pocos minutos, los receptores NMDA ionotrópicos y los AMPA/Kainato, de las neuronas expuestas al glutamato son activados originando una entrada masiva de calcio, sodio y agua con la subsecuente formación de edema citotóxico [23, 24]. Asimismo, las elevadas concentraciones de calcio intracelular incrementan el estrés oxidativo, que contribuye al daño celular [16]. La sobreactivación de los receptores de glutamato en la isquemia, lleva al incremento del calcio intracelular y a la activación de una gran cantidad de proteasas de cisteína como la calpaínas que son claves en los mecanismos de muerte neuronal [25], así como de enzimas dependientes de calcio como la sintasa del óxido nítrico (NOS) una enzima involucrada en la fisiopatología del IC [26] (Figura 2).

Estrés oxidante

El incremento de las concentraciones de calcio intracelular durante el evento isquémico favorece la formación de diversas especies reactivas de oxígeno (EROs) que llevan a la célula a un estado de estrés oxidativo, durante esta etapa los lípidos, las proteínas y el ADN son alterados de manera irreversible. El daño mitocondrial y el desacople de la cadena transportadora de electrones [27] producen EROs tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Durante la reperfusión la xantina deshidrogenasa se transforma en xantina oxidasa y forma anión superóxido [28], se incrementa la producción de óxido nítrico (NO) por la sobre activación de las isoformas de la sintasa del óxido nítrico neuronal (SONn), endotelial (SONe) e inducible (SONi), esta última expresada por citocinas ($TNF\alpha$, interferón γ e Interleucina β) sintetizadas en los astrocitos y en la microglía con particular importancia durante el evento isquémico. Se ha reportado que el NO sintetizado por la SONi tiene efectos citotóxicos [29]. El NO puede combinarse con las EROs como el anión superóxido para formar el peroxinitrito, una molécula altamente reactiva que oxida los grupos tioles contenidos en las proteínas, alterando su estructura y actividad [30]. Por otra parte, el incremento en la producción de EROs eventualmente lleva a la peroxidación de lípidos, un proceso que destruye las membranas celulares, desencadenando la muerte neuronal [31]. En el cerebro se encuentran grandes cantidades de metales de transición tales como el hierro, el cobre y el manganeso, estos metales son capaces de contribuir en las reacciones de oxidación-reducción y producir grandes cantidades de radicales libres a través de la reacción de Haber-Weiss. Así el fenómeno de la formación de EROs es extremadamente importante en la fisiopatología de la isquemia. Se ha sugerido que de 3-4 h después de la isquemia se debe neutralizar el daño por EROs para proveer neuroprotección y atenuar la destrucción tisular, por lo que, el uso de anti-oxidantes puede reducir el daño al tejido nervioso después de un evento isquémico [32] (Figura 2).

Inflamación

Durante un evento cerebral isquémico, se activan diversos mecanismos que reclutan al sitio de daño una gran cantidad de células inflamatorias. La sobreexpresión de moléculas de adhesión sintetizadas por las células endoteliales, como la ICAM, la ELAM y la P-selectina, así como el incremento en la síntesis de moléculas quimiotácticas producto de la liberación del ácido araquidónico por la activación de la fosfolipasa C a consecuencia del incremento en las concentraciones de calcio intracelular, promueven la llegada de polimorfonucleares que pueden causar mayor daño al tejido a través de enzimas citotóxicas como la mieloperoxidasa con capacidad para dañar a las membranas celulares [33]. Dentro de la primera hora después de la isquemia cerebral se sintetizan citocinas proinflamatorias como el $TNF\alpha$, IL-1 y la IL-6, con capacidad quimio-atrayente para los leucocitos y las células inflamatorias (linfocitos T) [16]. La reducción en la síntesis de estas moléculas que favorecen la respuesta inflamatoria y la respuesta inmune disminuyen significativamente el volumen de daño. En la zona del infarto las células de la microglía son activadas en pocas horas y en cuestión de días se transforman en fagocitos. Los Astrocitos por su parte, sintetizan neurotrofinas y forman la cicatriz glial. La microglía local y los macrófagos infiltrados

demarcan la zona del infarto y rápidamente remueven los *debris*. En la zona del infarto la mayoría de las neuronas mueren por necrosis y algunas pueden disparar los mecanismos de muerte celular programada y morir por apoptosis [33] (Figura 2).

Muerte celular por apoptosis

Existen diversos estudios que señalan que después de un evento isquémico cerebral las neuronas mueren por la activación de proteasas dirigidas a los residuos de aminoácidos aspartato y cisteína (caspasas). La activación de estas proteasas inician el proceso de muerte celular programada en la mayoría de las células localizadas en la zona de penumbra. Después del evento isquémico, da inicio la activación de las caspasas a la par de la translocación fuera de la membrana de la mitocondria de las proteínas Bax, Bak y otros BH3, miembros de la familia Bcl-2 [34]. La liberación del citocromo c, la procaspasa 9 y el factor 1 activador de la apoptosis (Apaf-1) de la membrana interna de la mitocondria, con la unión de estos tres elementos se forma el complejo apoptosómico que a su vez activa a la caspasa 3 (caspasa efectora), la caspasa-3 activa a las endonucleasas (enzimas que fragmentan el ADN), son eventos que dan la señal para la activación de enzimas de reparación como la PARS (polimerasa-poliADP-ribosa), esta enzima consume grandes cantidades de ATP promoviendo un mayor déficit energético, que eventualmente lleva a la fragmentación del ADN y a la muerte celular [35].

El factor de transcripción NF κ B, la vía del el c-jun-N-terminal cinasa, p53, E2F1 y otros factores de transcripción están probablemente involucrados en la sobreexpresión de las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. Otra vía de activación de las caspasas después de un evento isquémico, es a través de la activación de receptores Akt (receptores con actividad tirosina cinasa), que favorecen la liberación desde la mitocondria de un segundo activador de caspasas (Smac) o un inhibidor directo de la apoptosis unido a proteínas (DIABLO) [34]. Existen una gran cantidad de evidencias que señalan que la apoptosis es un mecanismo muy importante en los procesos fisiopatológicos después de un evento isquémico [36] (Figura 2).

Con base en estos antecedentes se han desarrollado diversas estrategias farmacológicas y no farmacológicas neuroprotectoras con la finalidad de regular o disminuir los principales mecanismos de daño secundario como son, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, la inflamación y la apoptosis para evitar la pérdida del tejido nervioso adyacente y detener el déficit neurológico irreversible.

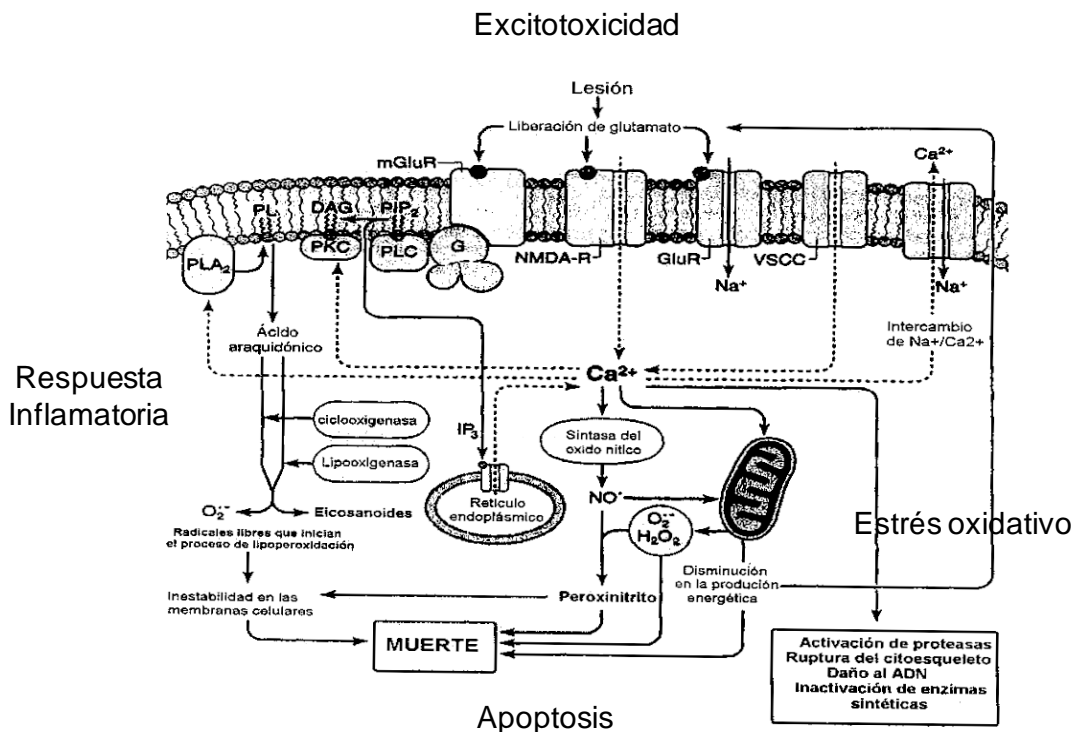


Figura 3. Imagen en la que se muestran los mecanismos de daño secundario que se desencadena a consecuencia del infarto. MGluR: receptor metabotrópico de glutamato; NMDA-R: receptor N-metil-D-aspartato; GluR: receptor de glutamato; VSCC: canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje; PLC: fosfolipasa C; PIP_2 : fosfatidilinositol 4,5 bifosfato; DAG: diacilglicerol; IP_3 : inositol 1,4,5; trifosfato; G: proteína G; SON: Sintasa del óxido nítrico; COX: ciclooxigenasa (Diagrama modificado de Siegel et al 1998) [37].

ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS

Anti-oxidantes.

Los neuropéptidos como el NAP (NAPVSIPQ) han demostrado tener efecto neuroprotector en un modelo de hipoxia/isquemia cerebral en ratas neonatas de siete días de edad, a las que se les practicó un modelo de hipoxia/isquemia, los animales fueron divididos en dos grupos, el control al que solo se le administró el vehículo y el tratado con NAP por vía i. p. a una dosis de 3 $\mu\text{g/g}$ a tipo cero (inmediatamente) o 24 h después de la hipoxia/Isquemia. En este estudio se evaluó el efecto antioxidante midiendo la peroxidación de lípidos y la cantidad de glutatión reducido (GSH) así como el daño al ADN, los resultados demostraron que el tratamiento previene el daño al ADN, disminuye la peroxidación lipídica y reestablece el GSH, por lo que los autores concluyen que el NAP es un buen tratamiento antioxidante [38]. La metalotioneína (MT) una proteína con capacidad antioxidante se ha propuesto como tratamiento neuroprotector en modelos murinos de IC. Existen cuatro isoformas de la proteína dos inducible (MT-I y la MT-II) y una constitutiva (MT III) que solo se ha localizado en el sistema nervioso central, principalmente en las neuronas [39]. A la MT se le han

asignado diferentes funciones como: almacenamiento y distribución de iones metálicos tales como el cobre, y el zinc; regulación de la biosíntesis y actividad de las metaloenzimas, citoprotección contra el daño producido por radicales libres y metales pesados, compartimentalización del zinc, detoxificación de los metales pesados del líquido cefalorraquídeo, del espacio extracelular por medio del epitelio coroideo y astrocitos [40].

En un estudio experimental de isquemia cerebral en ratones se investigó si el aumento en la expresión de MT en ratones transgénicos que sobre expresan la isoforma (MT-TG), protege al tejido nervioso del daño oxidativo producido por un IC focal con reperfusión al ser comparadas con un grupo control (wild type). En este estudio los animales fueron sometidos a un modelo del IC por la oclusión de la arteria cerebral media derecha durante 45 minutos, posteriormente la circulación sanguínea fue restituida con una procedimiento de reperfusión. Los resultados demostraron un incremento del edema por efecto del IC y la reperfusión cuyo pico máximo se presentó a las 24 h después del daño. Los estudios de imagen con resonancia magnética mostraron una menor cantidad de tejido dañado en los animales que sobre expresaron la MT-TG vs grupo control en todos los tiempos evaluados (6, 9, 24 y 72 horas y 14 día postreperfusion). Además, los estudios funcionales mostraron que a las 3 semanas después de la reperfusión los ratones con sobre expresión de MT tuvieron una mejor función motora estadísticamente significativa en comparación con los ratones del grupo control ($P = 0.011$).

Aunque los niveles corticales basales de ARNm de MT-I fueron similares en los ratones control y en los MT-TG, hubo un aumento en el ARNm de MT-I en la corteza isquémica de 7.5 veces comparado con los niveles basales, mientras que el aumento en los ratones control fue de 2.3 veces con respecto a los niveles de referencia a las 24 h después de la reperfusión. Además, los ratones MT-TGs mostraron un aumento de la inmunoreactividad para MT en los astrocitos, las células endoteliales y en las neuronas a las 24 horas después de la reperfusión cuando fueron comparados con los ratones de grupo control en los que la inmunoreactividad para MT se limitó principalmente a los astrocitos. Los autores concluyen que el aumento en la expresión de MT-I protege contra los efectos dañinos generados después de un IC con reperfusión [41]. De igual manera, nuestro grupo demostró que la administración exógena de 10 μg de MT-II tiene efecto neuroprotector en un modelo de IC con reperfusión. Los animales tratados con MT-II mostraron una mejoría funcional estadísticamente significativa al ser comparados con los valores obtenidos en el grupo control. Con respecto a la cantidad de tejido dañado, este fue menor en los animales tratados vs ratas no tratadas evaluados 96 h después de la isquemia.

En este estudio también se demostró que la MT-II tiene efecto ani-oxidante al disminuir la cantidad de productos finales de la lipoperoxidación, en la corteza, el estriado y el hipocampo evaluada 24 h después del infarto [42].

Otro tratamiento antioxidante propuesto es el resveratrol, que ha sido probado en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media con reperfusión en rata, en este estudio se administraron dos dosis de 7 a 10 mg/kg por vía i. v., la primera 15 min.

antes de la oclusión y la segunda en el momento de la reperfusión (2 h después de la oclusión). El resveratrol restauró de manera significativa el contenido de ATP y la actividad de complejos respiratorios mitocondriales al ser comparado con el grupo control. El Western blot mostró una marcada disminución en la liberación del citocromo c como resultado del tratamiento con resveratrol, con respecto al ADN del hipocampo se observó una marcada reducción de la fragmentación del ADN después del tratamiento, de forma particular, la expresión de Hsp70 y metalotioneína (MT) fue significativamente mayor en el grupo con control, pero su expresión era más significativa en el grupo tratado con resveratrol.

La cantidad de glutatión reducido mitocondrial (GSH), la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6-PD) y la lactato deshidrogenasa sérica fueron restauradas por el tratamiento, la peroxidación lipídica fue menor en el grupo tratado vs grupo control. Finalmente el resveratrol mejoró significativamente el déficits neurológicos evaluados por diferentes escalas funcionales [43]. La S-alil cisteína (SAC), un compuesto orgánico de azufre que se encuentran en el extracto de ajo, ha sido probado para reducir el estrés oxidativo asociado a una lesión cerebral después de la oclusión de arteria cerebral media (MCAO por sus siglas en inglés). Para probar esta hipótesis, ratas Wistar machos fueron sometidos a MCAO durante 2 horas y reperfusión de 22 horas, la S-alil cisteína se administró en dosis de 100 mg/kg, vía i.p. 30 minutos antes del inicio de la isquemia y después de la isquemia en el intervalo de 0, 6 y 12 horas. Veinticuatro horas después de la reperfusión, se realizaron pruebas conductuales, para determinar el déficit neurológico, así como pruebas histológicas para medir el volumen del infarto, se midió la peroxidación lipídica, el contenido de glutatión y la actividad de enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y superóxido dismutasa).

El tratamiento con SAC redujo significativamente volumen del daño isquémico el déficits neurológicos, el estrés oxidativo y la muerte neuronal. Los autores señalan que puede ser un buen tratamiento neuroprotector después de una IC con reperfusión [44]. De igual manera este efecto citoprotector de la SAC fue reportado por Atif y colaboradores [45] a través de su capacidad para disminuir la falla mitocondrial y por Kim y colaboradores [46] para disminuir la cantidad de peroxinitrito. Otro fármaco con capacidad anti-oxidante es la dapsona, Diaz-Ruiz y colaboradores [47] demostraron que el tratamiento inhibe la peroxidación de lípidos en ratas con IC por la MCAO con reperfusión al ser comparadas con el grupo control.

Por otra parte, los productos de origen natural han demostrado tener propiedades anti-oxidantes después de un IC, como ejemplos tenemos a la coumarina un derivado de la esculetina que administrada intra-cerebro ventricular, a una concentración de 20 µg disminuye el déficit neurológico y el estrés oxidativo producido por un daño isquémico en la rata [48], los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Nigella sativa*, que administrados en dosis de 400 mg/kg, por vía oral durante 7 días disminuyen el daño oxidativo y mejoran la función motora en los animales con IC [49], el péptido Cordymin purificado a partir del hongo medicinal *Cordyceps sinensis* que administrado por vía oral en un modelo de IC con reperfusión en rata aumenta

significativamente la actividad de las defensas antioxidantes y mejora la función neuroconductual [50].

Otra estrategia neuroprotectora son los péptidos derivados de la albumina, que han demostrado tener efecto antioxidante, en el 2010 nosotros demostrámos que el tetrapéptido L-Asp-Ala-His-Lys (DAHK), administrado a una dosis de 16 mg/kg 30 minutos después de producir un IC por la oclusión de la arteria cerebral media en ratas, disminuye el déficit neurológico y el tamaño del infarto cuando se compara con el grupo control. Estos resultados demuestran que el tratamiento con DAHK puede ser una alternativa terapéutica segura ya que, éste péptido forma parte de la albúmina que se encuentra en el suero humano [51]. Finalmente, los fármacos anti-inflamatorios pueden tener capacidad anti-oxidante, como ejemplo tenemos a la dapsona que utilizada en un modelo de IC con reperfusión en rata, demostró inhibir la peroxidación de lípidos que se incrementa por efecto de la reperfusión [47].

Tratamientos Anti-excitotóxicos

La mayoría de la transmisión excitatoria en el cerebro está mediada por el subtipo de receptor AMPA de los receptores ionotrópicos de glutamato. En muchas enfermedades neurológicas, la estructura de la sinapsis y la función del receptor de AMPA son alteradas, por lo que los receptores AMPA pueden ser blancos terapéuticos claves en los tratamientos empleados en la clínica [52]. En el IC los receptores AMPA permiten niveles citotóxicos de calcio en las neuronas, lo que lleva a la muerte celular. Desafortunadamente, muchos estudios clínicos han tenido un éxito limitado al dirigirse directamente los receptores AMPA en esta enfermedad. El uso de moduladores de los receptores AMPA, comúnmente conocidos como ampakinas, en principio parecía prometedores cuando se utilizaron en estudios con animales, sin embargo cuando se llevaron al uso terapéutico en estudios clínicos los resultados fueron ineficaces [52].

Las propiedades neuroprotectoras de bilobalida, un componente específico de extractos de Ginkgo, se probaron en un modelo de ratón con IC, después de 24 horas de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), los resultados demostraron que el tratamiento con bilobalida reduce las áreas de infarto en la región central (cuerpo estriado) en un 40-50% cuando se administra a 10mg/kg 1h antes de la MCAO. La neuroprotección también se observó con dosis más bajas, o cuando el fármaco se administró 1h después del IC. La función sensitivo motora en los ratones mejoró por efecto de tratamiento, los resultados del metabolismo cerebral evaluados *in situ* con un estudio de microdiálisis, mostraron una rápida baja en las concentraciones de la glucosa extracelular en el estriado por efecto de la MCAO, que regresó a los niveles basales después de la reperfusión.

Los niveles extracelulares de glutamato se incrementaron en más de diez veces y por cuatro a cinco veces en el tejido del hipocampo (penumbra). La bilobalida no afectó los niveles de glucosa, pero la liberación de glutamato fue fuertemente atenuada tanto en las regiones centrales como en la penumbra, el tratamiento fue igualmente activo cuando se administró localmente a través de una sonda de microdiálisis y también se redujo la isquemia inducida por la liberación de glutamato *in vitro* en un modelo de rebanadas de cerebro. Con estos resultados los autores concluye que la

bilobalida es un potente tratamiento neuroprotector tanto *in vivo* como *in vitro* a dosis que pueden ser utilizados terapéuticamente en humanos. El mecanismo de acción evidentemente implica la reducción de la liberación de glutamato, reduciendo así la excitotoxicidad [53]. Por otra parte, se sabe que la pérdida de la homeostasis del calcio es uno de los principales mecanismos que llevan a la muerte neuronal, el incremento en las concentraciones de calcio intracelular lleva a la excitotoxicidad mediada por glutamato ya que al unirse a su receptor de tipo NMDA se abren los canales de calcio acoplado a dicho receptor, que lleva a la subsecuente entrada de calcio a favor de su gradiente de concentración, durante este procesos se activan los canales iónicos denominados sensores de ácido (ASIC) que son dependientes de protones y selectivos de cationes, estos canales se expresan en el sistemas nerviosos periférico y central, la activación ASIC1a es debido a la acidosis y promueve el incremento del calcio intracelular durante la lesión isquémica.

Curiosamente, se encontró que el ASIC1a se inhibe por la acción de algunos flavonoides con propiedades anti-inflamatorios particularmente la quercetina. Con base en estos antecedentes Pandey y colaboradores [54] investigaron el efecto neuroprotector de la quercetina, además de su posible mecanismo de señalización en la isquemia cerebral focal. El tratamiento de la quercetina administrado 30 minutos antes de la isquemia y 4 h después de la reperfusión, muestra una protección significativa contra el daño isquémico observándose una reducción en el volumen del infarto cerebral y déficit neuroconductual. También, se observó una reducción del calcio y de las concentraciones de nitritos asociados con la baja concentración de esta molécula, con respecto al daño oxidativo, la concentración de malondialdehído MDA mostró una marcada reducción ($P < 0.01$) en las regiones cerebrales isquémicas, la calpaína fue un banco terapéutico de la quercetina ya que después de ser administrado el tratamiento los productos de degradación disminuyeron, finalmente los estudios *ex vivo* demostraron que el tratamiento inhibe los niveles de calcio intracelular mediada por protones en sinaptosomas de neuronas del cerebro de rata.

Por último, se demostró el efecto anti-excitotóxico del riluzol como un fármaco neuroprotector en modelos experimentales de isquemia cerebral. Sin embargo, las dosis utilizada en los animales son mucho mayores que las empleadas en los pacientes, por lo que se ha investigado su eficacia cuando es administrado a dosis bajas, para equiparar las dosis utilizadas en la clínica. Bae y colaboradores [55] evaluaron el efecto neuroprotector del riluzol administrado en dosis bajas en un modelo de IC global realizada en gerbos machos de Mongolia durante 5 minutos se administraron 0.8 mg/kg de riluzol por vía i. p. 30 min antes de la isquemia. Los resultados obtenidos a los siete días después de la isquemia, muestran que existen grandes cantidades de las células nerviosas sobrevivientes en el área CA1 del hipocampo, asimismo se observaron mejores tasas de sobrevivencia estadísticamente significativa en los animales tratados con riluzol.

Anti-inflamatorios

Los modelos de isquemia focal inducida por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en animales son útiles para dilucidar los mecanismos fisiopatológicos claves durante la IC como es el caso de la respuesta inflamatoria. Durante el evento

isquémico se ha demostrado que existe una modesta infiltración de neutrófilos a las 24 h después del daño, sobre todo alrededor de los vasos arteriales y en los márgenes del infarto, mientras que en la MCAO seguida de una reperfusión se observa una infiltración muy importante en toda el área del infarto. Basado en estas evidencias, se ha demostrado que la proteína C reactiva (PCR) (que es un marcador inflamatorio), se asocia con alteraciones vasculares a largo plazo que favorecen el incremento de células inflamatorias en el sitio del daño.

Varios fármacos, han demostrado tener la capacidad para reducir los niveles de PCRus como es la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (estatinas) que desminuyen la llegada de neutrófilos al sitio del infarto a través de un mecanismo que es independiente de sus efectos sobre el colesterol plasmático. También se sabe que durante el IC se expresan diversas citocinas en el cerebro como el TNF α una citocina pleiotrópica que tiene un papel clave en muchos procesos celulares fisiológicos y patológicos como la inflamación aguda y crónica así como en los mecanismos que llevan a la muerte celular programada (apoptosis). Diversos grupos de investigación han buscado moléculas con capacidad de inhibir la síntesis o la acción del TNF α . El SB-239063 han probado tener efecto antiinflamatorio cuando se administra por vía oral después de una lesión cerebral, regulando los mecanismos de daño asociados al TNF α , el tratamiento con SB-239063 demostró tener efecto neuroprotector al reducir el déficit neurológico en animales sometidos a un modelo de IC [56].

El uso de fármacos anti-inflamatorios como neuroprotectores ha sido desarrollada por diversos grupos de investigación en todo el mundo, utilizando modelos de IC e hipoxia/isquemia (HI) un ejemplo es el tratamiento con doxiciclina, en un estudio utilizando un modelo de HI en ratas neonato a las cuales se les administró dicho tratamiento, el efecto fue comparado con el observado en el grupo control. Se realizaron estudios de resonancia magnética e histología a los 42 días pos HI. Los resultados demostraron menor daño en la sustancia gris y en la sustancia blanca en los grupos tratados con doxiciclina, mientras que los ensayos histológicos apoyaron los resultados de resonancia magnética, observando una alta correlacionada entre los dos estudios. En conclusión, una sola dosis de doxiciclina reduce a largo plazo la pérdida de tejido cerebral y el daño en la sustancia blanca después de una HI neonatal [57].

Terapias combinadas fármacos anti-inflamatorios y sobre expresión de genes son estrategias terapéuticas prometedoras para el IC. En un estudio realizado por Hyun y colaboradores [58] demostraron el efecto neuroprotector de la terapia combinada con dexametasona y hemooxigenasa, en un modelo de isquemia focal transitoria en rata, los resultados demostraron que 24 h después de la inyección, el volumen del infarto y el nivel de TNF- α y citocinas proinflamatorias se redujeron en comparación con las observadas en el grupo control, concluyendo que dicha terapia puede ser útil para enfermedades isquémicas tales como los accidentes cerebrovasculares. Otro compuesto probado como tratamiento neuroprotector es la paeoniflorina, un componente de *paeonia lactiflora pall*, se cabe que esta molécula tiene la capacidad de inhibir la expresión del factor nuclear-kappa β en modelos de hipoperfusión, así como tener propiedades anti-inflamatorias. En un estudio realizado por Tang y

colaboradores [59] demostraron tanto el pre-tratamiento como el post-tratamiento con *paeonia lactiflora pall* reduce el área del infarto cerebral, así como el déficit neurológico, mientras que los niveles de IL-1beta, el TNF-alfa, la ICAM-1 de los microvasos y MPO se redujeron por efecto del tratamiento. Ríos y colaboradores [60] evaluaron el efecto neuroprotector de la dapsona en un modelo isquemia cerebral focal permanente por oclusión de la arteria cerebral media en rata, los resultados demostraron que los animales tratados con dapsona a una dosis de 12.5 mg/kg tuvieron un menor déficit neurológico, así como una mayor cantidad de tejido preservado al ser comparados con el grupo control, al que solo se le administró el vehículo.

Anti-apoptóticos

Los fármacos o moléculas con efecto anti-apoptótico también han sido probados como terapias neuroprotectoras en modelos de IC. El YGY-E que es un compuesto activo purificado de hierbas chinas utilizadas en la medicina tradicional ha demostrado tener efecto anti-isquémico, en un estudio realizado por An y colaboradores [61], estudiaron su ventana terapéutica en la isquémica cerebral, así como su efecto sobre la apoptosis neuronal. Los animales recibieron una inyección intravenosa de YGY-E a 1, 3 y 6 h, respectivamente, después de isquemia cerebral focal permanente inducida por electrocoagulación de la arteria cerebral media.

El tamaño del infarto y la función neurológica fueron evaluados para determinar los efectos de YGY-E, además fueron evaluados los efectos de este compuesto sobre la apoptosis neuronal y la síntesis de Bcl-2 y Bax en el tejido cerebral isquémico, con ensayos de TUNEL, de inmunohistoquímica y de Western blot. El YGY-E fue administrado a una dosis de 2-8 mg/kg, los resultados demostraron que el tratamiento tiene efecto neuroprotector de forma dosis dependiente observándose una disminución del tamaño del infarto, así como del déficit neurológico, del porcentaje de células TUNEL-positivas ($p < 0.01$) y de las células Bax-positivas ($p < 0.01$ o $p < 0.05$), de forma contraria se observó aumentó del porcentaje de células Bcl-2 positivas ($p < 0.01$ o $p < 0.05$). Estos datos demuestran que YGY-E tiene efectos protectores si se administra después de una IC en ratas, así mismo los autores demuestran que la ventana terapéutica es de hasta 6 horas. Finalmente, concluyen que los resultados protectores se deben a los efectos anti-apoptóticos que regulan el balance entre las proteínas Bcl-2 y Bax.

Otro compuesto que se ha probado es el Dan Shen, una sustancia derivada de la raíz seca o rizoma de la *Salvia miltiorrhiza* BGE, contiene tanshinona II (TSA) como uno de sus principios activos. Informes recientes han demostrado que la TSA puede inhibir la apoptosis en cultivos de células PC12. En un estudio realizado por Chen y colaboradores [62], investigaron los efectos de la TSA sobre la apoptosis cerebral inducida por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) durante 2 horas, y posteriormente se realizó la reperfusión en las ratas. Veinticuatro horas después de la reperfusión, fue evaluado el volumen del infarto el tratamiento se administró ipor vía i. p. a dos diferentes dosis al primera de 25 y la segunda de 40 mg/kg, el volumen del infarto así como el edema disminuyó significativamente, además se observó una disminución en el déficits neurológicos en forma dosis-dependiente, siendo la dosis de

25 mg/kg la más eficaz, esta dosis redujo significativamente la expresión de la caspasa-3 y aumentó la expresión Bcl-2 en la corteza cerebral isquémica, se observaron menos células positivas a la prueba de TUNEL en la zona de penumbra en el grupo tratado, comparado con el grupo al que solo se le administró el vehículo, los autores concluyen que el TSA tiene efecto neuroprotector después de un IC focal con reperfusión y este se ejerce probablemente por su capacidad anti-apoptótica. Otra estrategia propuesta son los antagonistas de los receptores a prostaglandinas, en un estudio realizado por Ikeda-Matsuo y colaboradores [63] en un modelo IC con reperfusión en ratas probaron el efecto protector del ONO-AE3-240 un antagonista del receptor EP3 de prostaglandinas, los resultados demostraron que el tratamiento reduce el tamaño del infarto, el edema, si como el déficit neurológico.

Por otra parte, la apoptosis neuronal en la corteza isquémica evaluada con la técnica de TUNEL y con inmunohistoquímica para caspasa-3 mostraron una reducción en los animales tratados con antagonistas EP3 al ser comparado con el grupo control el tratamiento también redujo el daño de la barrera hematoencefálica, la activación de la microglia y la infiltración de neutrófilos en la corteza isquémica. Estos resultados sugieren que receptor EP3 está implicado en el daño secundario que se desencadena después del infarto, la conclusión de este estudio fue que los antagonistas EP3 pueden una buena opción para el tratamiento del IC en los pacientes.

Los estrógenos son otra propuesta neuroprotectora para el IC. Aunque se sabe mucho sobre el efecto protector de la terapia de estrógeno en la isquemia cerebral aguda, se sabe relativamente poco sobre su importancia en la regulación de la apoptosis y la plasticidad cerebral. En este estudio desarrollado por Wappler y colaboradores [64] se evaluó el efecto del 17 β -estradiol en un modelo IC global producido por la oclusión bilateral de la carótida transitoria durante 10 minutos en jebos hembras ovariectomizadas, la apoptosis fue evaluada midiendo la expresión de Bcl-XL, Bax presentes en el cerebro y para evaluar la plasticidad se determino la presencia de GAP-43, sinapsina-I, estos marcadores fueron medidos cuatro días después de la cirugía. La expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-XL fueron mayores en el grupo tratado con estrógenos. Mientras que, la expresión de Bax o GAP 43 no presentaron cambios Estos resultados sugieren que la terapia con estrógenos durante la etapa aguda tiene efectos anti-apoptóticos y aumentan la plasticidad cerebral, que desempeñan un papel importante en la citoprotección.

La leonurina, un alcaloide presente en Herba Leonuri (HL), ha mostrado tener efectos biológicos, tales como antioxidantes, anticoagulantes y anti-apoptóticos, en un estudio realizado por Qi y colaboradores [65] probaron el efecto citoprotector de la leonurina sobre la falla mitocondrial en la corteza cerebral de ratas con isquemia cerebral y reperfusión, los animales recibieron el tratamiento durante 1 semana antes de practicarles la isquemia cerebral. Los resultados mostraron que leonurina mejora significativamente el déficit neurológico y reduce el tamaño del infarto cerebral 24 horas después del daño, además se observó una disminución de la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en las mitocondrias aisladas de la corteza isquémica, que se incrementaron por efecto del daño, mientras que los resultados del ensayo de TUNEL mostraron un efecto anti-apoptóticos de leonurina en

la corteza isquémica. El ensayo de Western blot mostró una marcada disminución en la expresión de Bax y un aumento de Bcl-2 como resultado del tratamiento con leonurina. Finalmente se pudo observar una reducción de la inflamación de la membrana mitocondrial, el restablecimiento del potencial de membrana mitocondrial. Con base en estos hallazgos, los autores sugieren que la leonurina tiene un efecto terapéutico prometedor para el tratamiento de IC a través de la inhibición del daño oxidativo y de la apoptosis.

Neuroprotectores y Terapias combinadas.

El litio, ha sido reconocido en los últimos 10 años por sus efectos neuroprotectores y neurotróficos en la isquemia cerebral, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Esto ha llevado al desarrollo de diversos estudios preclínicos y clínicos empleando al litio como tratamiento para diferentes enfermedades. Existen evidencias de que el tratamiento con litio tiene efecto neuroprotector al favorecer la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés) y del Bcl-2 [66].

Por otra parte se ha demostrado que prostaglandina A (PGA) y el litio tienen efecto neuroprotector en el IC y en el daño excitotóxico, Xu y colaboradores [67] probaron el efecto citoprotector de del litio y PGA1 evaluando la expresión de proteínas de choque térmico (HSP). Las ratas fueron pretratadas con litio durante 2 días y una sola administración de PGA 15 minutos antes de daño isquémico. La IC fue inducida por una oclusión permanente de la arteria cerebral media. El volumen del infarto, el déficit motor y el edema cerebral fueron evaluados 24 horas después de la lesión. Los resultados demostraron que la PGA y el litio redujeron significativamente el volumen del infarto, el déficits neurológicos y edema cerebral.

Los efectos neuroprotectores de la PGA fueron asociados con una regulación las proteínas citoprotectoras de choque térmico HSP70 y grp78 en el hemisferio cerebral isquémico según lo determinado por inmunotransferencia e inmunofluorescencia. Los autores concluyen que el litio puede potenciar los efectos neuroprotectores de la PGA. La terapia combinada de litio y prostaglandina E1 también resulto ser un potente tratamiento neuroprotector de acuerdo con lo reportado por Sheng y colaboradores [68].

La mezcla (PGE1 22,6 nmol/kg + Li 0.5 mmol/kg) redujo el volumen del infarto y déficits neurológicos inducidos por isquemia cerebral focal. Además, la mezcla tuvo un mayor efecto neuroprotector contra la isquemia cerebral en comparación con PGE1 o litio solo. La mezcla fue efectiva incluso si se administró 3 horas después de la isquemia. PGE1 + Li también incrementaron la citoprotección vía un mayor nivel de proteína de HSP70, GRP78, Hsp60, y Bcl-2 mientras que la expresión de p53 disminuyó.

Por otra parte, el tratamiento con litio fue probado en un modelo de hemorragia intra-cerebral en ratas [69], en este estudio los animales presentaron menor deterioro cognitivo y menor edema al ser comparados con el grupo control que no recibió el tratamiento, estos resultados demuestran una vez mas que el litio regula mecanismos importantes asociados con el daño tisular. Todas estas evidencias han llevado a

desarrollar modelos de hipoxia/isquemia en ratas neonatas, en estos estudios se ha demostrado que el tratamiento con litio promueve una reducción en la cantidad de tejido dañado y una mejor desempeño funcional [70].

El efecto anti-apoptótico del litio fue demostrado por Li y colaboradores [71] en un modelo de lesión cerebral con hipoxia/isquemia en neonatos de nueve días de edad, las ratas macho fueron sometidas de manera unilateral a la hipoxia-isquemia y 2 mmol/kg de cloruro de litio fue inyectado i.p. inmediatamente después de la lesión. Inyecciones adicionales de litio, 1 mmol/kg, se administraron a intervalos de 24 h. Las crías fueron sacrificadas 6, 24 o 72 h después del daño. Los resultados indicaron que el litio redujo el volumen del infarto en comparación con del vehículo a las 72 h después del infarto. Las lesiones se redujeron en la corteza, el hipocampo, el tálamo y el cuerpo estriado. El tratamiento redujo, la activación de la calpaína y la caspasa-3, la liberación del citocromo C de la mitocondrial un factor inductor de apoptosis, así como la autofagia.

Takahashi y colaboradores [72] evaluaron si el tratamiento con litio protege contra el daño cerebral después del accidente cerebrovascular en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) permanente en rata combinado con oclusión transitoria bilateral de la arteria carótida común (CCAo), un modelo que imita derrame cerebral humana con reperusión parcial. Además evaluaron si el tratamiento de litio altera la actividad medida por Akt, aunque se sabe que inhiben la actividad GSK3. Después del accidente cerebrovascular, la actividad de Akt contribuye a la sobrevivencia neuronal, mientras que la actividad de GSK3 provoca la muerte neuronal, el litio fue administrado redujo el tamaño del infarto que el cual fue evaluado con la técnica de cloruro de 2,3,5-trifenil (TTC) a las 48 horas después del IC, también se observó que se inhibe la muerte celular en la penumbra isquémica, pero no en el núcleo isquémico esto lo demuestra el ensayo de TUNEL realizado 24 horas después de la IC. Sin embargo, el tratamiento con litio no alteró la reducción de la actividad de Akt, medido por el ensayo de la cinasa Akt, además el litio no alteró los niveles de proteína GSK3 fosforilada, o la degradación de β -catenina, un sustrato de GSK3, lo cual es consistente con los hallazgos previos de que a largo plazo es necesario un tratamiento de litio para alterar la fosforilación GSK3. En resumen, los resultados demuestran que el litio protege contra el IC en un modelo de isquemia focal con reperusión parcial.

Las terapias combinadas neuroprotectoras han sido propuestas como una alternativa de tratamiento neuroprotector para el IC este es el caso del tratamiento con ciclosporina y eritropoyetina que fue probado en un modelo de IC en rata, en este estudio se demostró que la terapia combinada fue la mejor al mejorar la función neurológica, disminuir el tamaño del infarto, así como la apoptosis y la respuesta inflamatoria [73], efecto similar con monoterapia de eritropoyetina fue repostada por Dang y colaboradores [74] en ratas adultas y en ratas neonatas [75].

Otra propuesta de terapia neuroprotectora es la molécula llamada VELCADE, un inhibidor selectivo del proteasoma, administrado de manera combinada con el activador del plasminógeno tisular (tPA), esta terapia ha tenido resultados importante en el IC se

sabe que la ventana terapéutica es de 6 horas en ratas jóvenes, sin embargo, el IC es una causa importante de muerte y discapacidad en los ancianos. Por lo que Zhang y colaboradores [76] en 2010 realizaron un estudio en el que probaron el efecto de VELCADE en combinación con una dosis baja de tPA en ratas de edad avanzada después de un IC embólico, los resultados demostraron que el tratamiento con VELCADE redujo significativamente el volumen del infarto, mientras que el tPA por sí solo no muestra dicho efecto, por el contrario se incrementa el daño al ser comparados con los animales tratados solo con solución salina, la reducción de volumen del infarto, fue asociado con un aumento de la actividad de la sintasa del óxido nítrico endotelial, finalmente los autores demostraron que el tratamiento combinado promueve la trombólisis.

Hipotermia e Isquemia cerebral

Disminuir la temperatura corporal, puede reducir la lesión primaria y evitar lesiones secundarias en el cerebro después de una IC, este evento se conoce como hipotermia moderada, esta condición influye en múltiples aspectos de la fisiología del cerebro en la fase aguda, subaguda y crónica de la isquemia. Afecta a las vías que conducen a la excitotoxicidad, la apoptosis, la inflamación y la producción de radicales libres, así como el flujo sanguíneo y el metabolismo de la integridad de la barrera hematoencefálica. La hipotermia también puede influir en la neurogénesis, gliogénesis y la angiogénesis después de la lesión. Es probable que ningún factor pueda explicar la neuroprotección proporcionada por la hipotermia, pero la comprensión de sus múltiples efectos puede llevarnos a dilucidar los importantes mecanismos neuroprotectores que se observan con el uso de esta estrategia terapéutica [77].

En el 2012 Nagel y colaboradores [78] utilizaron la hipotermia como terapia neuroprotectora y analizaron la expresión de diversos genes relacionados con el daño secundario en un modelo de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) por 90 minutos y 48 h de la reperusión. La hipotermia fue inducida durante 4 h, a partir de 1 h después de MCAO. 48 h después se realizaron estudios de resonancia magnética para cuantificar el volumen del infarto, se realizaron además evaluaciones funcionales por medio de escalas neurológicas. Se realizó un estudio de micro arreglos de ADN para analizar la expresión de genes durante el IC. Los resultados mostraron que los animales sometidos a hipotermia redujeron significativamente el volumen del infarto y se observó un menor déficit neurológico a las 48 h en comparación con el grupo control sin hipotermia, con respecto al análisis de los genes, una gran cantidad de genes relacionados con la neuroprotección fueron sobre expresados por efecto de la hipotermia, así mismo pudieron identificarse nuevos genes potencialmente mediadores de la neuroprotección entre estos se encuentran el HNRNPAB, el HIG-1, y el JAK3, además se pudo establecer que muchos genes asociados con la apoptosis fueron suprimidos por efecto del tratamiento y que se regulan la expresión de varios genes implicados en la síntesis y plegamiento de proteínas, de la homeostasis del calcio, de la integridad celular y sináptica, de la inflamación y de la muerte celular.

Asimismo, los efectos benéficos de la hipotermia se han probado en modelos de isquemia cerebral en neonatos [79], en los cuales se ha demostrado que esta terapia

disminuye de manera importante una gran cantidad de mecanismos involucrados en la muerte celular y en el deterioro cognitivo de los animales, con base en esta información recientemente se ha propuesto el uso de la hipotermia como tratamiento neuroprotector en niños que presentan eventos de hipoxia/isquemia severa durante el nacimiento, ya que puede reducir la pérdida neuronal y mejorar la recuperación funcional [80].

Tratamientos neuroprotectores y medicina alternativa para el infarto cerebral

La electroacupuntura (EA) se ha propuesto como tratamiento preventivo en pacientes con alto riesgo de isquemia aguda y lesiones por reperfusión. Muchos estudios han demostrado que los mecanismos de protección del pretratamiento con EA puede regular una serie de mecanismos moleculares que mejoran la actividad de los antioxidantes, del sistema de endocannabinoide, de la participación del sistema beta-adrenérgico, de la vía de señalización de los posreceptores y la inhibición de la apoptosis [81]. Zhou y colaboradores [82] probaron el efecto neuroprotector de la EA en ratas sometidas a un modelo de oclusión de arteria cerebral media (MCAO) con control continuo del flujo sanguíneo cerebral. La EA fue hecha en los puntos de acupuntura de "shuigou" (Du 26) y "Baihui" (Du 20) con diferentes intensidades y frecuencias para optimizar los parámetros de estimulación. Los resultados mostraron que: 1) EA en 1.0-1.2 mA y 5-20 Hz notablemente redujeron el infarto isquémico, el déficit neurológico, y tasa de mortalidad, 2) el tratamiento de EA aumentó el flujo sanguíneo, que apareció inmediatamente después de la iniciación de la EA y desapareció después de la finalización del estímulo, 3) el tratamiento de la EA promovió la recuperación del flujo sanguíneo después de MCAO; 4) parámetros "no óptimos" de la EA (por ejemplo, <0.6 mA o > Hz 40) no puede mejorar el flujo sanguíneo o reducir la lesión isquémica. Los autores sugieren que el tratamiento de la EA protege al cerebro de la isquemia cerebral aumentando el flujo sanguíneo en la región cerebral isquémica a través de una regulación rápida.

Tratamientos neuroprotectores en la clínica

La adhesión de los leucocitos al endotelio vascular para abandonar la circulación sanguínea y dirigirse a la zona de daño, es un proceso que se ha explorado durante el IC. Este proceso inicia por la adhesión de los leucocitos a la pared de los vasos sanguíneos por medio de las proteínas de adhesión celular llamadas ICAMs, para evitar que este evento ocurra se han probado anticuerpos anti-ICAM-1 (enlimomab) con la finalidad de detener la llegada de células inflamatorias al sitio del daño. En un estudio multicéntrico llevado a cabo en el 2001 se probó el efecto del enlimomab en un total de 625 pacientes con accidente cerebrovascular isquémico, los cuales fueron aleatorizados para recibir ya sea enlimomab (n = 317) o placebo (n = 308) dentro de las primeras 6 horas de presentarse el IC. El tratamiento se administró durante 5 días. Los pacientes fueron evaluados al inicio del estudio y en los días 5 y 90 después del inicio del tratamiento; evaluaciones a largo plazo se llevaron a cabo 6 y 12 meses después del IC.

La respuesta funcional fue evaluada a los 90 días utilizando la escala de Rankin modificada; otros criterios de valoración incluyeron el índice de Barthel (BI) y la Escala NIH Stroke y la sobrevivencia. Los resultados de la evaluación realizada a los 90 días después del IC con la escala de Rankin modificada, mostraron un peor desempeño funcional en los pacientes tratados con enlimomab al ser comparados con los valores del grupo tratado con placebo ($p = 0.004$), también demostró una mortalidad mayor en el grupo tratado que fue del 22.2% frente a la observada en el grupo control que fue del 16.2%.

El efecto negativo de enlimomab fue evidente desde los días 5, 30 y 90 de tratamiento ($p = 0.005$). Hubo más eventos adversos con el tratamiento que con el placebo, sobre todo en la presencia de las infecciones y fiebres. Los pacientes que presenten fiebre fueron más propensos a tener un mal resultado o morir. Los autores concluyen que la terapia anti-ICAM con enlimomab no es un tratamiento eficaz para el IC, de hecho puede empeorar de manera significativa la evolución del padecimiento [83]. La minociclina es un derivado semisintético del grupo de antibióticos de la tetraciclina, que tienen efectos neuroprotectores, estos han sido demostrados en modelos animales con accidente cerebro vascular. En un estudio clínico aleatorizado cegado simple se probó el efecto neuroprotector de la minociclina administrada en dosis de 200 mg por día durante 5 días mientras que el grupo control recibió capsulas de vitamina B por vía oral.

Los pacientes fueron evaluados con las escalas de los Institutos Nacionales de Salud para infarto (NIHSS por sus siglas en ingles), la escala modificada de Barthel (MBI) y la escala de Rankin modificada (MRS), se realizaron también estudios de Imágenes por Resonancia Magnética (IRM) del cerebro y estudios de laboratorio de rutina. Las evaluaciones con las escalas clínicas de realizaron a 1, 7 y 30 días posteriores al IC con una evaluación final realizada a los 3 meses (90 días). Cincuenta pacientes con accidente cerebro vascular isquémico agudo fueron incluidos en el estudio. De éstos, 23 pacientes recibieron minociclina y 27 pacientes recibieron placebo es decir, cápsulas de vitamina B. La evaluación con la escala NIHSS en pacientes que reciben minociclina demostró una mejora estadísticamente significativa en el día 30 y 90 en comparación con los controles.

De manera similar, las puntuaciones obtenidas de la evaluación funcional por medio de las escalas MRS y BI mostraron una mejora significativa en los pacientes que reciben la minociclina vs grupo control solo cuando fueron evaluados hasta los tres meses, No hubo mortalidad, infarto de miocardio ni accidentes cerebro vasculares recurrentes. Con base en estos resultados los autores concluyen que los pacientes con accidente cerebro vascular isquémico agudo tienen resultados significativamente mejores con el tratamiento con minociclina, en comparación con los que recibieron placebo [84]. Por otra parte, se ha descrito que los atiplaquetarios (AP) puede aumentar el riesgo de hemorragia intracerebral sintomática (ICH) después de la trombolisis intravenosa que se origina después del accidente cerebrovascular isquémico.

Con base en esto se realizó un estudio en el que se evaluó la seguridad de la trombolisis en los en 11, 865 pacientes que cumplieron con los criterios de seguridad

que marcan los lineamientos europeos entre 2002 y 2007 en la Aplicación Segura de los tratamientos en el Infarto (SITS por sus siglas en inglés) y el Registro Internacional de Trombolisis de infarto (SITS-ISTR). Un total de 3.782 (31,9%) pacientes habían recibido 1 ó 2 fármacos antiplaquetarios (AP) al inicio del estudio: 3.016 (25,4%) de ácido acetilsalicílico (AAS), 243 (2,0%) clopidogrel, 175 (1,5%) ASA y dipiridamol, 151 (1,3%) AAS y clopidogrel, y 197 (1,7%) entre otros. Los pacientes tratados con AP durante 5 años tuvieron más factores de riesgo que los pacientes no tratados previamente AP. Con base en esta información los autores concluyen que aunque se recomienda precaución en pacientes que recibieron la combinación de AAS y clopidogrel, el tratamiento AP no debe considerarse una contraindicación para la trombolisis [85].

El tratamiento con citicolina fue probada en pacientes con IC en un estudio realizado por Davalos y colaboradores [86], en este estudio se demostró que este fármaco producía una mejoría del 25% en promedio, tres meses después de su administración a pacientes con infarto cerebral, en tanto que los pacientes que recibieron placebo mejoraron un 20% en promedio.

Como se puede deducir de estos resultados, este tratamiento farmacológico es incapaz de reducir el daño cerebral asociado con el infarto cerebral en más de un 20-30 % en promedio, por lo que, su uso clínico no ha sido aprobado por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA). Recientemente fueron publicados los resultados en la revista Lancet del un estudio multicéntrico con la citicolina, para tratar de confirmar la eficacia de este tratamiento con un mayor número de pacientes. Se realizó un estudio aleatorizado, controlado con placebo, en pacientes con un moderado a grave evento cerebro vascular isquémico agudo, los pacientes fueron ingresados en hospitales Universitarios en Alemania, Portugal y España, se diseñó un estudio en el que los tratamientos fueron asignados aleatoriamente en una proporción 1:1 para recibir citicolina o placebo dentro de las 24 h después de la aparición de los síntomas (1000 mg cada 12 h por vía intravenosa durante los primeros 3 días y de forma oral a partir de entonces, para un total de 6 semanas 2 x 500 mg comprimidos orales administrados cada 12 horas).

La recuperación funcional fue evaluada a los 90 días por medio de una prueba global que combina tres indicadores de mejoría: La escala validada por los Institutos Nacionales de Salud Stroke Scale ≤ 1 , modificada de Rankin ≤ 1 , y el índice de Barthel ≥ 95 . Los criterios para la valoración de seguridad incluyen hemorragia intracraneal sintomática en pacientes tratados con activador tisular del plasminógeno recombinante, deterioro neurológico, y la mortalidad. Este ensayo fue registrado, con el número NCT00331890. Los resultados de 2298 pacientes que fueron incluidos en el estudio del 26 de noviembre 2006, al 27 de octubre de 2011 en 37 centros de España, 11 de Portugal y 11 de Alemania. De los 2298 pacientes que dieron su consentimiento informado y se les asignación los tratamientos al azar, 1.148 fueron asignados a la citicolina y 1150 con el placebo.

El ensayo fue interrumpido por futilidad en el tercer análisis provisional sobre la base de datos completos de 2078 pacientes. El análisis al azar final se basó en los datos de 2298 pacientes: 1148 en el grupo de citicolina y 1150 en el grupo placebo. La

recuperación global fue similar en ambos grupos ($p = 0.364$) ya que no se observaron diferencias significativas en las variables de seguridad ni en la tasa de eventos adversos las conclusiones a este estudio fueron que: la citicolina no es eficaz como el tratamiento para el accidente cerebrovascular isquémico agudo de moderado a grave [87]. La trombólisis es una estrategia terapéutica que ha demostrado darles beneficios a los pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo menores de 80 años que son tratados dentro de las primeras 4 a 5 horas del inicio de la isquemia, el objetivo de este estudio fue determinar si la administración del tratamiento hasta 6 h desde el inicio del accidente cerebrovascular tiene efectos benéficos para los pacientes.

Se realizó un estudio internacional, multicéntrico, aleatorizado y abierto en pacientes tratados o no con 0.9 mg/kg por vía intravenosa del activador del plasminógeno tisular recombinante (rt-PA). En este estudio fueron incluidos 3035 pacientes inscritos en 156 hospitales de 12 países, 1515 recibieron el tratamiento con rt-PA y 1520 formaron parte del grupo control, de los cuales 1617 (53%) eran mayores de 80 años. A los 6 meses, 554 (37%) de los pacientes del grupo con rt-PA y 534 (35%) en el grupo control estaban vivos e independientes lo que representa un beneficio del 6 % un aumento en términos absolutos no significativo. En el análisis de hemorragia intracraneal sintomática fatal o no fatal dentro de 7 días, ésta se presentó en 104 (7%) de los pacientes del grupo de rt-PA versus 16 (1%) en el grupo control observándose mayor cantidad de muertes ocurridas dentro de 7 días en el grupo de rt-PA, sin embargo entre 7 días y 6 meses hubo menos muertes en el grupo de rt-PA que en el grupo de control. Los autores concluyen que a pesar de los riesgos iniciales (ya que se observó una mortalidad importante dentro de los primeros 7 días), la trombolisis generada por efecto del tratamiento con rt-PA dentro de 6 horas tiene buenos resultados y se observa un beneficio que no parece ser disminuido en pacientes de edad avanzada [88]. Otro tratamiento neuroprotector probado en la clínica es el sulfato de magnesio, en un estudio multicéntrico fase III con 2589 pacientes con diagnóstico de infarto cerebral, los resultados de este estudio demostraron que el tratamiento no mejora la función neurológica ni disminuye la mortalidad asociada al infarto [89].

Así, la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos para prevenir las consecuencias del infarto cerebral han producido resultados decepcionantes. En el año 2001, por ejemplo, la FDA aprobó el uso de 5 fármacos contra las enfermedades cardíacas, y ningún fármaco contra el infarto cerebral [90]. Esto conlleva a que en la actualidad no exista un tratamiento medicamentoso de elección para este grave padecimiento. En vista de las graves consecuencias que el infarto cerebral acarrea a la Sociedad en términos de gasto por rehabilitación y cuidados médicos, se decidió buscar un nuevo agente terapéutico más eficaz que los actuales. Nuestro grupo realizó un estudio piloto doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo en pacientes con IC de la arteria cerebral media utilizando a la dapsona (4,4'-diamino-difenil) como tratamiento, con base en los resultados de un estudio previo de isquemia cerebral en ratas, en el cual la dapsona se asoció con un efecto neuroprotector, tomando en cuenta que la dapsona es un fármaco seguro con pocos efectos adversos reportados, se realizó un ensayo clínico piloto para evaluar la posibilidad de su administración en

pacientes con infarto cerebral, el ensayo clínico piloto se llevó a cabo entre enero de 1999 a enero de 2000.

Treinta pacientes fueron incluidos en el estudio y el accidente cerebrovascular isquémico en el territorio de la arteria cerebral media fue corroborado con estudios de imagen por medio de una tomografía o una resonancia magnética. Los pacientes con más de 4 puntos en la escala de los Instituto Nacional de Salud Stroke Scale (NIHSS) fueron asignados aleatoriamente para recibir una dosis única de dapsona 200 mg o placebo. Durante el seguimiento los pacientes fueron evaluados con la escala de NIHSS a los 0, 2, 7 y 60 días después del evento isquémico, también fue empleada la escala de Rankin modificada y el índice de Barthel, estas fueron aplicadas a los 60 días después del IC. Las reacciones adversas también fueron registradas. El punto de corte principal fue considerado cuando el paciente obtuvo una variación de 2 puntos para la escala de Rankin modificada y 17 puntos para el índice de Barthel. Los resultados demostraron que quince pacientes recibieron dapsona y 15 recibieron placebo. Veintinueve fueron seguidos durante 60 días y un paciente en el grupo de tratamiento murió durante el seguimiento, los resultados favorables se obtuvieron en los pacientes tratados con dapsona en todas las escalas empleadas; NIHSS ($p = 0.032$), Barthel ($p = 0.049$) y la escala de Rankin (RR = 0,182, IC 95%: 0,04 a 0,86). Los mejores resultados se obtienen cuando el tratamiento se inició dentro de los primeros 8-10 horas después del IC y no se observaron reacciones adversas relacionadas con el medicamento, con base en estos resultados, la dapsona demostró ser un fármaco útil y seguro para el tratamiento de pacientes con accidente cerebrovascular [91].

CONCLUSIONES

Las terapias farmacológicas y no farmacológicas que se han probado como tratamientos neuroprotectores durante la etapa aguda del infarto cerebral, han tenido mejores resultados en los últimos años, esto se debe, probablemente al avance en el entendimiento de la compleja cascada de eventos de daño secundario que se desencadenan a consecuencia del daño inicial. Sin embargo es importante destacar que a pesar de la gran cantidad de terapias neuroprotectoras probadas en modelos experimentales que han demostrado tener un gran potencial terapéutico, cuando son llevados a la práctica clínica los resultados son decepcionantes, un ejemplo es el uso de la citicolina que no tuvo efecto neuroprotector en pacientes con infarto cerebral y que después de realizar un estudio multicéntrico se concluyó que no favorece la recuperación funcional de los pacientes, resultados similares fueron observados con el sulfato de magnesio que de igual forma fue probado en un estudio multicéntrico. De manera reciente se dieron a conocer los resultados obtenidos del efecto neuroprotector del tratamiento con el activador del plasminógeno tisular recombinante (rt-PA), las complicaciones por el uso de este tratamiento mostraron un riesgo importante dentro de los primeros 7 días, mientras que la recuperación funcional fue similar que la del grupo de pacientes que solo recibió el placebo, con base en esto los autores concluyen que a pesar de los riesgos iniciales (alta mortalidad dentro de los primeros 7 días), la trombolisis generada por efecto del tratamiento con rt-PA dentro de 6 horas tiene buenos resultados y se observa un beneficio que no parece ser disminuido en pacientes de edad avanzada. Bajo este panorama podemos concluir que en la

actualidad no se cuenta con ninguna terapia neuroprotectora eficaz que revierta el daño secundario que se presenta después de una IC.

REFERENCIAS

1. Mukherjee, D. y Patil, C.G. (2011) *World Neurosurg.* **76**: S85-90.
2. Michaud, C.M., Murray, C.J. y Bloom, B.R. (2001) *JAMA* **285**: 535-539.
3. Strong, K., Mathers, C. y Bonita, R. (2007) *Lancet Neurol.* **6**: 182-187.
4. Williams GR. (2001) *BMC Neurol* **18**: 1-2.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012) *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **25**: 379-382.
6. Heuschmann, P.U., Di Carlo, A., Bejot, Y., et al. (2009) *Stroke* **40**: 1557-1563.
7. Kulshreshtha, A., Anderson, L.M., Goyal, A., et al. (2012) *Euroepidemiology.* **38**: 123-129.
8. Ferri, C.P., Acosta, D., Guerra, M., et al. (2012) *PLoS Med.* **9**: 1001179.
9. Elkind, M.S. (2010) *Stroke.* **41**, S3-8.
10. Pullicino, P.M. (1993) *Adv Neurol.* **62**, 125-140.
11. Broussalis, E., Trinkka, E., Killer, M., et al. (2012) *Drug Discov Today.* **3** (Epub ahead of print)
12. Jovičević, M., Divjak, I., Slankamenac, P., et al. (2010) *Med Pregl.* **63**: 324-332.
13. Ingall, T.J. (2000) *Postgrad Med.* **107**: 34-46.
14. Kirshner, H.S. (2003) *South Med J.* **96**: 354-358.
15. Aronowski, J., Cho, K.H., Strong, R., et al. (1999) *J Cereb Blood Flow Metab.* **19**: 652-660
16. Leker, R.R. y Shohami, E. (2002) *Brain Res Brain Res Rev.* **39**: 55-73.
17. Bramlett, H.M. y Dietrich, W.D. (2004) *J Cereb Blood Flow Metab.* **24**: 133-150.
18. Kaufmann, A.M., Firlik, A.D., Fukui, M.B., et al. (1999) *Stroke.* **30**: 93-99.
19. Zivin JA. (1998) *Neurology.* **50**: 599-603.
20. White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J. et al. (2000) *J Neurol Sci.* **179**: 1-33.
21. Leker, R.R., Aharonowiz, M., Greig, N.H., et al. (2004) *Exp Neurol.* **187**: 478-486.
22. Baird, A.E., Benfield, A., Schlaug, G., et al. (1997) *Ann Neurol.* **41**: 581-589.
23. Choi, D. (1998) *Mt Sinai J Med.* **65**: 133-138.
24. Dirnagl, U., Iadecola, C. y Moskowitz, M.A. (1999) *Trends Neurosci. Trends Neurosci.* **22**: 391-397.
25. Araújo, I.M., Carreira, B.P., Carvalho, C.M., et al. (2010) *Neurochem Res.* **35**: 1966-1969.
26. Zhou L, Zhu DY. (2009) *Nitric Oxide* **20**: 223-230.
27. Sims, N.R. y Anderson, M.F. (2002) *Neurochem Int.* **40**: 511-526.
28. Juurlink, B.H. (1997) *Neurosci Biobehav Rev.* **21**: (2): v-vi.
29. Wink DA, Mitchell JB (1998) *Free Radic Biol Med.* **25**: 434-456.
30. Moro, M.A., Cardenas, A., Hurtado, O., et al. (2004) *Cell Calcium.* **36**: 265-275.
31. Stolc, S., Vlkolinsky, R. y Pavlasek, J. (1997) *Brain Res Bull.* **42**: 335-340.
32. Kavanagh, R.J. y Kam, P.C. (2001) *Br J Anaesth.* **86**: 110-119.
33. Stoll, G., Jander, S. y Schroeter, M. (1998) *Prog Neurobiol.* **56**: 149-171
34. Love, S. (2003) *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **27**: 267-282.
35. Snider, B.J., Gottron, F.J. y Choi, D.W. (1999) *Ann N Y Acad Sci.* **893**: 243-253.
36. Ng, I., Yeo, T.T., Tang, W.Y., et al. (2000) *Neurosurgery* **46**: 949-956.

-
37. Siegel, G., Agranoff, B., Albers, R., et al. (1998). 6a edition, Lippincott Raven; New York. 1104.
 38. Greggio, S., de Paula, S., de Oliveira, I.M., et al. (2011) *Neurobiol Dis.* **44**: 152-159.
 39. Vela JM, Hidalgo J, González B, Castellano B. (1997) *Brain Res.* **5**: 345-355.
 40. Aschner M. (1996) *FASEB J.* **10**: 1129-1136.
 41. Van-Lookeren-Campagne, M., Thibodeaux, H., van Bruggen, N., et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 12870-12875.
 42. Vacio Adame Martha Patricia. (2012) Tesis de Maestría de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
 43. Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda N, Ishrat T, Khan B, Islam F. (2009) *Brain Res.* **1250**: 242-53.
 44. Ashafaq, M., Khan, M.M., Shadab Raza, S., et al. (2012) *Nutr Res.* **32**: 133-143.
 45. Atif, F., Yousuf, S. y Agrawal SK. (2009) *Brain Res.* **10**: 128-137.
 46. Kim, J.M., Lee, J.C., Chang, N., et al. (2006) *Free Radic Res.* **40**: 827-835.
 47. Diaz-Ruiz, A., Zavala, C., Montes, S., et al. (2008) *J Neurosci Res.* **86**: 3410-3419.
 48. (a)Wang C, Pei A, Chen J, Yu H, Sun ML, Liu CF, Xu X. (2012) *J Neurochem.* **121**: 1007-1013.
 49. Akhtar, M., Maikiyo, A.M., Khanam. R., et al. (2012) *J Pharm Bioallied Sci.* **4**: 70-75.
 50. (b)Wang J, Liu YM, Cao W, Yao KW, Liu ZQ, Guo JY. (2012) *Metab Brain Dis.* **27**: 159-165.
 51. Díaz-Ruiz, A., Ríos, C., Carvajal-Sotelo, J., et al. (2010) *Neurochem Res.* **35**: 343-347.
 52. Chang, P.K., Verbich, D. y McKinney, R.A. (2012) *Eur J Neurosci.* **35**: 1908-1916.
 53. Lang, D., Kiewert, C., Mdzinarishvili, A., et al. (2011) *Brain Res.* **24**: 155-163.
 54. Pandey, A.K., Hazari, P.P., Patnaik, R., et al. (2012) *Brain Res.* **6**: 289-299.
 55. Bae, H.J., Lee, Y.S., Kang, D.W., et al. (2000) *Neurosci Lett.* **294** : 29-32.
 56. Tuttolomondo, A., Di, Sciacca, R., Di Raimondo, et al. (2009) *Curr Top Med Chem.* **9**: 1240-1260.
 57. Widerøe, M., Havnes, M.B., Morken, T.S., et al. (2012) *Eur J Neurosci.* **17**: (Epub ahead of print).
 58. Hyun, H., Lee, J., Hwang do, W., et al. (2011) *Biomaterials* **32**: 306-315.
 59. Tang, N.Y., Liu, C.H., Hsieh, C.T., et al. (2010) *Am J Chin Med.* **38**: 51-64.
 60. Ríos, C., Nader-Kawachi, J., Rodriguez-Payán, A.J., et al. (2004) *Brain Res.* **5**: 212-215.
 61. An, Y.T., Zhao, Z., Sheng, Y.C., et al. (2011) *Drug Discov Ther.* **5**: 76-83.
 62. Chen, Y., Wu, X., Yu, S., et al. (2012) *Biol Pharm Bull.* **35**: 164-170.
 63. Ikeda-Matsuo, Y., Tanji, H., Narumiya, S., et al. (2012) *J Neuroimmunol.* **238**: 34-43.
 64. Wappler EA, Gál A, Skopál J, Nagy Z. (2011) *Acta Physiol Hung.* **98**:189-194.
 65. Qi, J., Hong, Z.Y., Xin, H., et al. (2010) *Biol Pharm Bull.* **33**: 1958-1964.
 66. Gold, A.B., Herrmann, N. y Lanctôt, K.L. (2011) *Curr Drug Targets.* **12**: 243-255.
 67. Xu XH, Zhang HL, Han R, Gu ZL, Qin ZH. (2006) *Brain Res.* **1102**: 154-162.
 68. Sheng, R., Zhang, L.S., Han, R., et al. (2011) *Acta Pharmacol Sin.* **32**: 303-310.
 69. Kang, K., Kim, Y.J., Kim, Y.H., et al. (2012) *Neurol Res.* **20**: (Epub ahead of print).
 70. Shin, W.J., Gwak, M., Baek, C.H., et al. (2012) *Childs Nerv Syst.* **28**: 191-198.
 71. Li, Q., Li, H., Roughton, K., et al. (2010) *Cell Death Dis.* **15**: e56.
 72. Takahashi, T., Steinberg, G.K. y Zhao, H. (2012) *Aging Dis.* **3**: 226-233.
 73. Yuen, C.M., Sun, C.K., Lin, Y.C., et al. (2011) *J Transl Med.* **9**: 141-155.

74. Dang, S., Liu, X., Fu, P., et al. (2011) *Neurol Res.* **33**: 520-528.
75. Yamada, M., Burke, C., Colditz, P., et al. (2011) *J Pathol.* **224**: 101-109
76. Zhang, L., Zhang, Z.G., Buller, B., et al. (2010) *Stroke.* **41**: 1001-1007.
77. Yenari MA, Han HS. (2012) *Nat Rev Neurosci.* **13**: 267-278.
78. Nagel, S., Papadakis, M., Pflieger, K., et al. (2012) *Neuroscience*, **19**: 109-122.
79. Thornton, C., Rousset, C.I, Kichev, A., et al. (2012) *Neurol Res Int.* **2012**: 506320.
80. Drury, P.P., Bennet, L. y Gunn, A.J. (2010) *Semin Fetal Neonatal Med.* **15**: 287-92.
81. Li, X., Luo, P., Wang, Q., et al. (2012) *Evid Based Complement Alternat Med.* **2012**: DI 195397.
82. Zhou F, Guo J, Cheng J, Wu G, Xia Y. (2011) *J Appl Physiol.* **111**: 1877-1887.
83. Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators. (2001) *Neurology.* **57**: 1428-1434.
84. Padma-Srivastava, M.V., Bhasin, A., Bhatia, R., et al. (2012) *Neurol India* **60**: 23-28.
85. Diedler, J., Ahmed, N., Sykora, M., et al. (2010) *Stroke* **41**, 288-294.
86. Dávalos, A., Castillo, J., Alvarez-Sabín, J., et al. (2002) *Stroke.* **33**: 2850-2857.
87. Dávalos, A., Alvarez-Sabín, J., Castillo, J., et al. (2012) *Lancet.* **9**: (Epub ahead of print).
88. The IST-3 collaborative group. (2012) *Lancet* **23**: (Epub ahead of print).
89. Muir, K.W., Lees, K.R., Ford, I., et al. (2004) *Lancet* **363** : 439-445.
90. Bogousslavsky, J., Aarli, J. y Kimura, J. (2003) *Lancet Neurol.* **2**: 212-213.
91. Nader-Kawachi, J., Góngora-Rivera, F., Santos-Zambrano, J., et al. (2007) *Neurol Res.* **29**: 331-334.

Semblanza del Dr. Luís Camilo Ríos Castañeda



El Dr. Ríos nació en la Ciudad de Pachuca Hidalgo, el 25 de Agosto de 1959. Se tituló como Químico, con Mención honorífica, en la Facultad de Química de la UNAM (1983). Después de cursar la Especialidad en Estadística Aplicada en el IIMAS de la propia Universidad, realizó estudios de Maestría en Investigación Biomédica

Básica, bajo la tutoría del Dr. Ricardo Tapia. En 1994 obtuvo el Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Farmacología, en el CINVESTAV, del IPN, bajo la tutoría del Dr. Alonso Fernández-Guasti.

El Dr. Ríos ha sido Director de Investigación y actualmente, Jefe del Departamento de Neuroquímica, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. El trabajo de investigación científica del Dr. Ríos se refleja en los más de 160 artículos publicados en revistas científicas internacionales arbitradas, con más de 2600 citas a su obra. El Dr. Ríos es Investigador Nacional Nivel 3, del Sistema Nacional de Investigadores, desde el año 2004.

Ha sido miembro del Comité Editorial de las revistas *TOXICOLOGY LETTERS* y *REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACEUTICAS*, actualmente, es Co-Editor

de la *REVISTA DE INVESTIGACION CLINICA*, órgano oficial de los Institutos Nacionales de Salud de México. Ha sido miembro de las comisiones de proyectos científicos y de evaluación del Sistema Nacional de Investigadores, del CONACYT y es miembro Titular de la Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas y miembro numerario de la Academia Nacional de Medicina de México.

Gracias a su investigación sobre los mecanismos de daño por radicales libres, el Dr. Ríos ha desarrollado un fármaco neuroprotector, que ha sido empleado con éxito en pacientes con infarto cerebral. Con este descubrimiento, se podrá evitar el daño neuronal y la discapacidad física asociada con este padecimiento, la tercera causa de muerte y la primera de discapacidad en el mundo. Actualmente, el Dr. Ríos ha recibido el registro oficial de la Secretaría de Salud para el uso del medicamento (NeuroProd®). Como una forma de ampliar el uso del medicamento, el Dr. Ríos ha registrado un ensayo clínico fase III para el medicamento (ClinicalTrials.gov). El mismo medicamento neuroprotector se emplea actualmente, en un ensayo clínico Fase II, como tratamiento de la Lesión traumática de la médula espinal.

En colaboración con investigadores de la UAM-I, del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y del IMSS, el Dr. Ríos ha sintetizado varios polímeros derivados del pirrol, mediante la técnica de plasma, que permiten reconectar la médula espinal seccionada de ratas. El presente año se iniciaran las pruebas del efecto de los polímeros en un modelo experimental en macacos (*m. Rhesus*), como paso previo a su aplicación en seres humanos. El Dr. Ríos es titular de ocho patentes Nacionales y varias internacionales, que protegen los descubrimientos que ha realizado. Una de estas patentes, se encuentra licenciada para su explotación comercial a una Empresa Farmacéutica Nacional (NeuroProd®).

Bajo la dirección del Dr. Ríos se han graduado 16 Maestros y 14 Doctores en Ciencias, en los diversos programas de posgrado de excelencia de la UAM, la UNAM y El CINVESTAV del IPN. Tres de estas Tesis han sido premiadas como Mejor Tesis de Doctorado por los Institutos Nacionales de Salud, en los años 2005, 2008 y 2009.

En reconocimiento a su labor científica, el Dr. Ríos ha sido ganador de diversos premios nacionales e internacionales de investigación, como: El Premio Gen (en dos ocasiones), el Premio Glaxo-Wellcome (en dos ocasiones), el Premio de la Coordinación de los Institutos Nacionales de Salud (en 4 ocasiones), el premio de la Western Pharmacology Society, y el Premio Nacional de Química, "Andrés Manuel del Río" 2011.



Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Vázquez Meza H (eds.) **Mensaje Bioquímico, Vol. XXXVI, 200 – 211**, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

ISSN-0188-137X

LA EPIGENÉTICA, LA OTRA CARA DE LA GENÉTICA

Dr. Raúl N. Ondarza, D.Sc.,

Profesor Titular de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM e Investigador en Ciencias Médicas del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública
ondarza@unam.mx

Resumen

La epigenética es la disciplina que se ocupa de investigar cómo los hijos pueden heredar y expresar lo que aparentan ser nuevos rasgos provenientes del comportamiento y entorno de sus padres sin cambios en el ADN. Existen algunos factores epigenéticos que afectan la expresión de nuestros genes, estos mecanismos responden a distintos factores del ambiente, como la exposición a sustancias químicas, los hábitos alimenticios y, en general, el estilo de vida.

El ADN no existe en la célula como una molécula desnuda; está asociado con proteínas llamadas histonas, las modificaciones de las histonas y las variantes de las mismas, son participantes fundamentales en los procesos epigenéticos de todos los organismos. Un número de enfermedades como ciertos tipos de cáncer, son debidas a un “silenciamiento” de genes originado por modificaciones epigenéticas.

Palabras clave: epigenética, genética, cáncer.

Abstract

Epigenetics is the discipline that deals with investigating how children can inherit and express what appear to be new coming features of behavior and environment of their parents without changes in the DNA. There are some epigenetic factors that affect the expression of our genes, mechanisms to respond to various factors of the environment, such as exposure to chemicals, eating habits and, in general, the style of life.

DNA does not exist in the cell as a molecule naked; it is associated with proteins called histones, histone modifications and variations of them, they are key participants in all organisms epigenetic processes. A number of diseases such as certain types of cancer are due to “silencing” genes that are due to epigenetic modifications.

Keywords: epigenetics, genetics, cancer.

¿Qué es la epigenética?

La epigenética es la disciplina que se ocupa de investigar cómo los hijos pueden heredar y expresar lo que aparentan ser nuevos rasgos provenientes del comportamiento y entorno de sus padres sin cambios en el ADN subyacente. En otras palabras, las instrucciones provenientes del código hereditario *son las mismas*, pero *algo* las cancela sin que el componente genético se altere.

A menudo se atribuye a Conrad Waddington (1905-1975) la acuñación del término “epigenética” en el año 1942 como “la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo” [1].

Las primeras apariciones de la epigenética en la literatura datan de mediados del siglo XIX, aunque los orígenes del concepto pueden encontrarse ya en Aristóteles (384-322 a. C.) quien creía en la epigénesis: el desarrollo de la forma orgánica del individuo a partir de la materia amorfa.

La diferenciación celular es el mejor ejemplo de la Epigenética

Durante la morfogénesis, las líneas celulares de las células “stem” totipotentes, se convierten en varias líneas celulares pluripotentes del embrión, las cuales se transforman en células totalmente diferenciadas.

En otros términos, una sola célula huevo fertilizada – el cigote– cambia en varios tipos de células como neuronas, células musculares, epitelio, vasos sanguíneos etc. a medida que continúan dividiéndose. Esto sucede así por la activación de unos genes, mientras que otros se inhiben.

El ADN no existe en la célula como una molécula desnuda; está asociado con proteínas llamadas histonas, constituyendo asociaciones llamadas nucleosomas, las cuales a su vez forman un componente complejo conocido como “cromatina” [2].

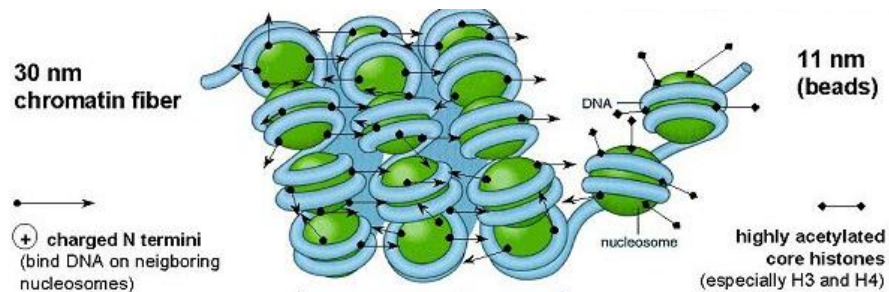


Figura 1. Fibra de cromatina formada por ADN e histonas.

El nucleosoma está compuesto de ADN y un octámero de histonas de dos copias cada una de H3, H4, H2A, y H2B. La histona externa, llamada H1, desempeña un papel clave en la compactación de los nucleosomas. Las modificaciones de las histonas y las variantes de las mismas, son participantes fundamentales en los procesos epigenéticos de todos los organismos.

Los cambios estructurales de la cromatina tienen una profunda influencia sobre la expresión genética:

- Si la cromatina se condensa, las enzimas involucradas en la expresión (ARN polimerasa) no pueden llegar al ADN y los genes estarán “apagados”,
- Por el contrario, si la cromatina está ‘abierta’, los genes pueden ser “encendidos” cuando se requieran.

Principales modificaciones epigenéticas

Mientras que varios desórdenes heredables en los humanos son causados por mutaciones en las secuencias del ADN - un número de enfermedades como ciertos tipos de cáncer, son debidas a un “silenciamiento” de genes originado por modificaciones epigenéticas [3].

El “silenciamiento” de genes y las principales formas de modificación epigenética son:

- Por metilación del ADN y
- Por desacetilación de las histonas.

El campo de la epigenética dió su primer paso con el descubrimiento de las ADN-metil transferasas (DMTs), que catalizan la unión de los grupos metilo (-CH₃) a los nucleótidos de citosina de una de las dos bandas, en base al molde de la banda complementaria. A esto se le conoce como la “teoría de la metilación” [4,5].

Sin embargo, un efecto más general se debe a las enzimas desacetilasas de histonas (HDAC), que al actuar, cambian la estructura de la cromatina [6].

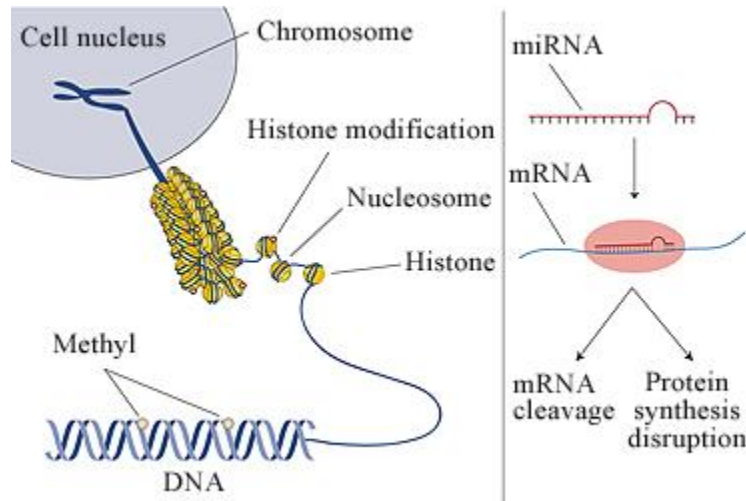


Figura 2. Izquierda: representación esquemática del ADN y su empaquetamiento con histonas en los cromosomas, y sus modificaciones epigenéticas. Derecha: representación sobre cómo los microARNs, (una forma de pequeños ARNs no codificantes), reconocen a un ARNm por homología en las secuencias, logrando su rompimiento y bloqueando su traducción en una proteína.

Hambre de Invierno

Aunque el campo de la epigenética, tal y como se conoce actualmente, ha estado utilizándose desde hace unos 20 años aproximadamente, el término de epigenética se emplea desde el principio de los 1940s.

Los registros detallados de nacimientos colectados durante la llamada “Hambre de Invierno” (Dutch Hunger Winter) han dado datos útiles para analizar los efectos a largo término sobre la salud de los prenales de madres expuestas a las consecuencias del hambre [7].

Esto sucedió hacia finales de la segunda Guerra Mundial, cuando los alemanes le impusieron un embargo de alimentos a Holanda Occidental --una área densamente poblada que sufrió escasez de alimentos, tierras agrícolas deterioradas y el comienzo de un invierno crudo-- todo lo cual condujo a la muerte por hambre de alrededor de unos 30,000 individuos.

Con los estudios realizados, no solo se pudieron relacionar las consecuencias a la exposición al hambre con un amplio margen de alteraciones en el desarrollo del producto, como bajo peso al nacer, sino además en la etapa adulta, con la diabetes, obesidad, enfermedad de las coronarias, cáncer de mama y otros y también se

encontró en un grupo de individuos, una asociación con el nacimiento de nietos mucho más pequeños de lo normal.

Este hallazgo es extraordinario, puesto que sugiere que una dieta deficiente en una madre embarazada, puede afectarla en su salud no solo a ella, sino también a sus hijos y a sus nietos (y posiblemente a sus bisnietos) que heredan el mismo tipo de problemas. En otros términos: “Somos lo que nuestras abuelas comieron”.

En otro estudio, no relacionado al “Hambre de Invierno”, varios investigadores correlacionaron el acceso a los alimentos por los abuelos, con la diabetes y enfermedades cardíacas de los nietos. Pero, ¿no implica esto una flagrante herejía?, O sea, ¿significa esto que estamos aceptado la idea Lamarckiana sobre la herencia de las características adquiridas?

Jean-Baptiste Lamarck (1744-1829) es mejor recordado por una teoría desacreditada, “la herencia de los caracteres adquiridos”. El proponía que los cambios ambientales causaban cambios en la conducta, los cuales a su vez conducían a un aumento o disminución de estructuras particulares. "El tubo básicamente una buena idea pero un mal ejemplo," dice Rohl Oflsson, de Uppsala University, Sweden.

Por otra parte, cuando menos en el caso de los resultados obtenidos con ratones “agouti”, la contestación sería afirmativa, puesto que los investigadores de la Universidad de Duke pudieron demostrar que la dieta puede alterar drásticamente los cambios fenotípicos heredables en estos ratones, pero no por un cambio en la secuencia del ADN, sino cambiando el patrón de metilación del ADN del genoma del ratón [8]. Los patrones epigenéticos son tan sensibles a los cambios ambientales, que en el caso de los ratones “agouti”, estos cambios pueden alterar el fenotipo en una sola generación.

Por ejemplo, cuando se alimentan hembras embarazadas “agouti” con ácido fólico y otros alimentos ricos en grupos metilo, a pesar de que la camada hereda exactamente el mismo gen “agouti” (sin diferencias en las secuencia nucleotídicas) los ratones que reciben suplementos alimenticios nacen con un pelaje color del café, mientras que los ratones de hembras que no recibieron suplementos son de pelaje amarillo y con una alta susceptibilidad a la obesidad, diabetes y cáncer [9].



Figura 3. El ratón de la izquierda es Agouti, el de la derecha es el normal. Mismo genoma, diferente epigenoma.

Lo que sucede es, que el ácido fólico, además de ser un buen suplemento alimenticio, puede tener un impacto dramático sobre la herencia, pero no cambiando la secuencia del ADN de un gen vía un polimorfismo de un solo nucleótido, sino cambiando el patrón de metilación de ese gen.

Los alimentos ricos en folato (vitamina B9) incluyendo los vegetales de hoja verde, frutos cítricos y fresas, son fuentes de grupos metilo (-CH₃). La Vitamina B12, que se halla en el pescado, carne, leche y huevos, puede donar también grupos metilo al metabolismo.



Figura 4. Frutos cítricos, Fresas y Kiwis.

Qué sucede en el ser humano

El enfoque actual de la investigación epigenética en el ser humano está en gran parte limitada al estudio fetal. Está bien claro que los primeros días que siguen a la concepción, cuando la futura madre aun no sabe que está encinta, resultan los más críticos de lo que hubiéramos imaginado, pues es precisamente en esta etapa cuando los genes importantes se “prenden” y se “apagan“, transmitiendo o no las primeras señales epigenéticas al feto en desarrollo.

El útero se constituye, entonces, en un verdadero laboratorio donde se evalúan rasgos que pueden o no asistir en la supervivencia del feto. Varias investigaciones demuestran que en muchos abortos espontáneos el feto mostraba anomalías genéticas. He aquí cómo la epigenética puede explicar parcialmente la epidemia de la obesidad (la infantil en particular).

Efectos de una mala dieta durante el embarazo

Los “*fast food*“, que constituyen la dieta de la mayoría de los americanos, es alta en calorías pero baja en nutrientes, especialmente aquellos elementos que son esenciales para el desarrollo de un embrión en las etapas tempranas de su gestación.

Si una mujer recién embarazada, se pasa las primeras semanas de su gravidez comiendo una dieta típica de “*junk food*“, el embrión puede recibir la señal de que va a nacer en un entorno hostil donde los alimentos esenciales escasean. Por medio de una

combinación de efectos epigenéticos, varios genes se prenden y se apagan, resultando en un bebé que nacerá pequeño, necesitando menos comida para la supervivencia y volviéndose obeso en el futuro.

Muchas mujeres vegetarianas se preguntan, ¿cuáles podrían ser los efectos al tener este tipo de dieta, sobre el desarrollo del pequeño durante el embarazo?. Sin embargo, con un buen plan alimenticio no hay por qué preocuparse.

Son varios los aspectos positivos de una dieta vegetariana, por ejemplo: las proteínas de los vegetales son menos problema para los riñones y ayuda a evitar la caída de los dientes, lo cual es común durante el embarazo. Además, la dieta vegetariana en general, disminuye el riesgo de padecer los siguientes padecimientos:

- Obesidad, Hipertensión, Constipación, Trastornos cardíacos, Diabetes tipo 2, Cáncer y Cálculos biliares.

Una desventaja es que se requiere de un mayor esfuerzo y planeación para mantener una dieta vegetariana, ya que en general, a medida que se omiten más alimentos en la dieta, se hace más difícil satisfacer los requerimientos nutritivos, de tal modo que hay que recurrir a vitaminas y minerales suplementarios.

Una mujer vegetariana que se alimenta de lácteos y huevo, además de un suplemento en base a minerales y multi-vitamínicos, puede obtener todos los nutrientes necesarios para un embarazo saludable. Sin embargo, aquella que evita los productos de origen animal, necesitará tomar la vitamina B12 y el Hierro, además de calcio, zinc y vitamina D.

- Embarazo y dieta vegetariana

La guía nutricional, para una mujer vegetariana que está embarazada, es la misma que para una no-vegetariana también embarazada. "Todas necesitan hierro adicional, calcio, folato, ácidos grasos esenciales tales como el ácido Docosahexaenoico (DHA) que es un ácido graso omega-3 que se halla en peces de aguas frías y en las algas marinas. Este ácido graso es un principal componente del cerebro (97%) y la retina (93%).

Las mujeres embarazadas deberán consumir las grasas, los dulces y los alimentos "chatarra" en forma moderada y cuidarse de evitar:

- Quesos no pasteurizados (como el Brie, Camembert, y Feta) así como la leche sin pasteurizar, ya que tienen el riesgo de enfermarse por la *Listeriosis* (una enfermedad causada por la bacteria *Listeria monocytogenes*).
- Vegetales y jugos de frutas no pasteurizados, los cuales pueden contener bacterias como *E. coli* y *Salmonella*.

La Hipótesis de Barker

David Barker, fue el primero en sugerir una relación entre la nutrición fetal deficiente y la obesidad posterior. Su teoría hoy se conoce como la Teoría del “genotipo económico” [10].

Es así, que cuando un bebé nacía con un genotipo económico, 10,000 años atrás, durante un período de escasez de alimentos, su metabolismo conservacionista lo ayudaría a sobrevivir al hambre relativa. Pero, cuando un bebé nace ahora, en el siglo XXI rodeado de comida en exceso, que es pobre nutricionalmente y rica en calorías, el bebé engorda.

En el caso de la obesidad, puede decirse que la metilación de los genes responsables comienza mucho antes de que nazca el niño y que la industria de los *fast foods*, cuyos productos acarrean sustancias nocivas y elementos químicos, que no sólo son incompatibles, sino que afectan a quienes los consumen (los colorantes artificiales y el glutamato monosódico) puedan ser responsables por la epidemia de obesidad que nos invade.

Por tanto, para poder eliminar su presencia y su avance, los esfuerzos hay que efectuarlos al nivel muy por encima del gen, o sea al nivel epigenético. Asunto éste que muy pocos logran porque, en su ignorancia, no lo reconocen. Mientras tanto, las mujeres embarazadas deben estar conscientes de lo que comen, porque el efecto de esa comida puede reflejarse no solo en los nietos sino aún más allá, hasta los bisnietos.

El mecanismo involucrado en el caso de la herencia de la madre a través de la abuela, es el sanguíneo: Cuando una futura madre nace, ella ya posee el complemento total de los óvulos que tendrá de por vida en sus ovarios desde bebé. Extraño como parezca, eso significa que el huevo del que nos desarrollamos con la mitad de los cromosomas propios, fue creado en los ovarios de nuestra mamá, cuando ella todavía residía en el útero de nuestra abuela.

Pero hay más, debido a que las modificaciones del genoma son trans-generacionales, se han obtenido pruebas que apoyan el impacto que tiene la epigenética de abuelos y abuelas en sus nietos. La evidencia científica indica que cuando la abuela pasó señales epigenéticas a la madre de uno, ella pasaría asimismo esas señales que eventualmente constituirán la mitad del ADN de la persona en cuestión.

El efecto de fumar tabaco en edad temprana

Estudios muy recientes, llevados a cabo en la Gran Bretaña, encuentran que los individuos que comenzaron a fumar antes de la pubertad tuvieron hijos que eran mucho más gordos que lo considerado normal cuando cumplían los nueve años. Lo sorprendente es que esta correlación afectaba a los hijos varones exclusivamente. Los expertos en epigenética deducen que en este caso, los indicadores epigenéticos se transmiten vía el cromosoma Y [11].

LA EPIGENÉTICA Y LA ENFERMEDAD

En el caso de la enfermedad, existen claramente factores genéticos involucrados, pero también otros factores, o sea que siempre habrá la combinación de factores genéticos y epigenéticos, así como los ambientales que determinan todas estas enfermedades.

Si a alguien se le hubiese ocurrido proponer antes de los 80's, que la regulación epigenética jugaba un papel en la carcinogénesis, se le habría tomado por "torpe". Esta situación cambió, cuando Feinberg y Vogelstein en 1983, ambos de la Johns Hopkins University, informaron que existía una relación entre las células cancerosas humanas y los patrones aberrantes de células con ADN metilado [12,13].

Ahora, como la modificación epigenética juega un papel tan importante en el cáncer, se han comenzado a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la reversión de la metilación y en la inhibición de la desacetilación de las histonas. Esto se hace combinando nuevas tecnologías para escudriñar rápidamente el genoma y ver los patrones de metilación del ADN y de acetilación de las histonas.

Sin embargo, las enfermedades pueden también ser causadas por una activación inapropiada de los genes. Un ejemplo es el linfoma de Burkitt, el cual se origina por una "sobreactividad" del gen llamado *myc*. En situación normal el gen se halla en la cromatina reprimida y se expresa a un nivel muy bajo. Su función es promover la proliferación celular.

El linfoma de Burkitt es una forma rara de cáncer que afecta principalmente a niños en África Central. Esta forma de cáncer está asociada a una infección con el virus de Epstein-Barr [14].

El término Linfoma es amplio y comprende varios tipos de cáncer del sistema linfático. Este sistema contribuye a eliminar las bacterias y a combatir la enfermedad. En un linfoma, algunas de las células del sistema linfático se multiplican de manera incontrolable y si todas las células son del mismo tipo se les llama malignas o cancerosas.

La metilación del ADN generalmente apaga la expresión genética y una de las características es la propagación confiable de su patrón genómico, desde una generación a la siguiente. Aproximadamente un 70% de todos los dinucleótidos de CpG en el genoma de los mamíferos, están metilados. El resto de los agrupamientos, cerca del extremo 5' de los genes conocidos como islas de CpG, están protegidos.

Muy poca metilación a lo largo del genoma, o demasiada metilación en las islas de CpG, puede causar problemas; en el primer caso activando a los oncogenes cercanos y en el segundo, apagando los genes supresores de tumores.

Cuando Feinberg y Vogelstein asociaron el cáncer a la epigenética, lo hicieron específicamente en base a una amplia hipometilación de todo el genoma. Unos años después otro grupo de investigadores, alemanes y norteamericanos, descubrieron una

relación entre el cáncer y un silenciamiento de los genes supresores de los tumores, pero causada por una hipermetilación. Ambos fenómenos, de hipo- e hipermetilación, pueden jugar un papel regulador importante, aún en el mismo tumor.

El verdadero asunto de la epigenética, es la de una relación causal entre el síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) y un agrupamiento de genes “troquelados”, entre los cuales se incluye al gen del factor del crecimiento tipo insulina o gen, *Igf2* (*insulin like growth factor*) [15,16].

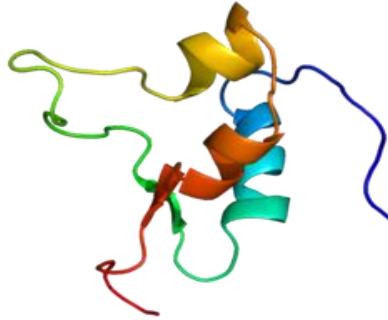


Figura 5. El IGF2 (somatomedina A), es una de las tres hormonas proteínicas que comparten una similitud con la estructura de la insulina.

El troquelado (Imprinting) es el marcaje diferencial con metilos y expresión de genes, el cual depende de si proceden de la madre o del padre. El gen *Igf2* (factor del crecimiento) es uno de los mejor caracterizados: se apaga en el cromosoma materno (es decir se apaga por metilación) de tal modo que solo la copia paterna es la que se expresa.

El papel etiológico de la epigenética en la formación de tumores ha impulsado la búsqueda de drogas con actividad antitumoral las cuales puedan corregir la herencia epigenética alterada. En los Estados Unidos el Departamento de Drogas y Alimentos ha aprobado el inhibidor epigenético **azacitidine**, para el tratamiento del Síndrome de desorden óseo mielodisplásico. La droga enciende los genes que han sido apagados por la metilación epigenética.

NIÑOS DE PROBETA

La herencia epigenética ha sido asociada a otras alteraciones cuya incidencia es mayor en niños que nacieron con ayuda de la tecnología reproductiva asistida, ART (Assisted Reproduction Technology) conocidos también como “niños de probeta”.

En estos casos, los embriones que se desarrollan anormalmente en un ambiente no protegido, - lo normal sería en el vientre materno -, al ser expuestos a un cultivo artificial en una caja de Petri, se encontraran en condiciones subóptimas y los sitios de metilación en el ovocito no estarán adecuadamente mantenidos y los patrones de troquelado (imprinting) podrán perderse durante el desarrollo del producto.

Los individuos concebidos por estas técnicas (ART) corren el gran riesgo de nacer, o con el Síndrome BWS, ó con el Síndrome Angelman (un desorden neurogenético raro, bautizado después de que el pediatra inglés Dr. Harry Angelman describió el síndrome en 1965) ó con retinoblastoma (un tumor de la retina) que se hallan ligados a errores de "imprinting".

CONCLUSIONES

El aumento en la comprensión del cambio epigenético y las pruebas recientes que indican su papel en la herencia y el desarrollo, no le dan mayor importancia a la que tiene el ADN, pero eso sí, la genética y la epigenética van "mano con mano".

REFERENCIAS

1. Waddington, C.H. (1942) *Endeavour*. **1**: 18–20.
2. Kornberg, R. D. (1974) *Science*. **184**, 868–871.
3. Jaenisch, R. and Bird, A. (2003) *Nature genetics*. **33** (3s): 245–254.
4. Steven, S., Smith, B. Kaplan E., Sowers L. C. and. Newman E. M. (1992) *Proceedings of the National Academy of Science*. **89** (10): 4748–4744.
5. Kumar, S., Cheng, X., Klimasauskas, S., Mi, S., Posfai, J., Roberts, R. J., Wilson, G. G. (1994) *Nucleic Acids Res*. **22** (1): 1–10.
6. De Ruijter, A.J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., van Kuilenburg, A. B. (2003) *Biochem J*. **370** (3): 737–749.
7. Banning, C. "Food Shortage and Public Health, First Half of 1945, " *Annals of the American Academy of Political and Social Science*". Vol. **245**, The Netherlands during German Occupation (May, 1946), pp. 93–110.
8. Dolinoy D. C. (2008) *Nut Rev*. **66** (1):S7–11.
9. Waterland, R. A. and Jirtle, R. L. (2003) *Molec Cell Biol*. **23** (15): 5293–5300.
10. Barker, D.J.P. (1997) *Nut*. **13**: 807
11. Breton, C. V., Byun, H. M., Wenten, M., Pan, F., Yang, A. and Gilliland, F. D. (2009). *Am J Respir Crit Care Med*. **180** (5): 462–467.
12. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) *Nature*. **301**: 89–92.
13. Robertson, K. D. (2005) *Nature*. **6**: 597–610.
14. Burkitt, D. (1958) *Br J Surgery*. **46** (197): 218–23.
15. Twigg, S. M. and Baxter, R. C. (1998). *J. Biol. Chem*. **273** (11): 6074–9.
16. Firth, S. M., Ganeshprasad, U., Baxter, R. C. (1998) *J. Biol. Chem*. **273** (5): 2631–8.

Semblanza del Dr. Raúl N. Ondarza Vidaurrieta



Es profesor titular de tiempo completo de la Facultad de Medicina, UNAM. Sus líneas de investigación han sido la Bioquímica y Biología Molecular. Las enzimas disulfuro oxido-reductasas susceptibles a drogas y los nuevos compuestos tioles de bajo peso molecular en parásitos de humanos.

Obtuvo el título de Biólogo, por la Facultad de Ciencias, UNAM en 1951 y el doctorado en Biología (Bioquímica) en 1963, también en la UNAM. Fue Profesor Fundador de la Cátedra de Biología Molecular en la Facultad de Ciencias, UNAM en 1963. Nombrado Dr. *Honoris Causa* por la Université de Paris XIII, (Republique Francaise, Ministère de l'Éducation Nationale, Académie de Créteil, 1984).

Socio Fundador (en 1957) y Presidente (1967-69) de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Socio Fundador (1959) y Presidente (1971-72) de la Academia Mexicana de Ciencias. Miembro Numerario de la Academia Nacional de Medicina desde 1962 a 1980 y Miembro Titular de 1980 a la fecha. Miembro de la American Society of Biochemistry and Molecular Biology de 1974 a la fecha. Actualmente Miembro Emérito.

A publicado más de 15 libros, siendo los más recientes: "Bioquímica Médica", Trillas eds, 2010, "Virus y Enfermedad", Trillas eds. 2011, "SOS: Salvemos la Tierra", 2011. Cuenta con 10 capítulos en libros, 16 artículos de revisión, 37 artículos de divulgación y 50 artículos científicos.